FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

ANNÉE 1931 N° 25

Thèse présentée pour le Doctorat en médecine

par

ADNOT André Pierre

Né à Epernay le 13 juillet 1901

Ancien Interne des Hôpitaux de Strasbourg

Contribution à l'étude des protides du sérum Dosage de la globuline et de la sérine par une nouvelle méthode.

Président: M. MERKLEN, Professeur

Les Editions Universitaires de Strasbourg
1a, Place de l'Université * Quai du Maire Dietrich 1
STRASBOURG
R. C. Strasbourg 3677

FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

ANNÉE 1931 N° 25

Thèse présentée pour le Doctorat en médecine

PAR

ADNOT André Pierre

Né à Epernay le 13 juillet 1901

Ancien Interne des Hôpitaux de Strasbourg

Contribution à l'étude des protides du sérum Dosage de la globuline et de la sérine par une nouvelle méthode.

Président: M. MERKLEN, Professeur

Les Editions Universitaires de Strasbourg

1a, Place de l'Université — Quai du Maire Dietrich, 1

(Foyer Universitaire)

STRASBOURG

R. c. Strasbourg 3677

1931

FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG

Doyen	MM.	MERKLEN ✲ ⁂ I.
Assesseur		NICLOUX ✲ ⁂ I.

Professeurs

Embryologie	MM.	ANCEL ✲ ⁂ I.
Anatomie		FORSTER ✲ ⁂ I.
Histologie		BOUIN O. ✲ ⁂ I.
Physiologie		SCHAEFFER ⁂ I.
Physique biologique		VLES ✲ ⁂ I.
Chimie biologique		NICLOUX ✲ ⁂ I.
Anatomie pathologique		MASSON ✲ ⁂ I.
Pharmacologie, Médecine expérimentale		N.....
Hygiène, Bactériologie		BORREL C. ✲ ⁂ A.
Médecine légale		CHAVIGNY C. ✲ ⁂ I.
Clinique médicale	(	MERKLEN ✲ ⁂ I.
	(	AMBARD ✲ ⁂ I.
Clinique chirurgicale	(	LERICHE O. ✲ ⁂ I.
	(	STOLZ ✲ ⁂ I.
Clinique ophtalmologique		WEILL ⁂ I.
Clinique dermatologique		PAUTRIER O. ✲ ⁂ I.
Clinique psychiatrique		PFERSDORFF ✲ ⁂ I.
Clinique neurologique		BARRE ✲ ⁂ I.
Clinique gynécologique et accouchements		REEB ⁂ I.
Clinique infantile		ROHMER ✲ ⁂ I.
Clinique oto-rhino-laryngologique		CANUYT ⁂ A.

Professeurs sans chaire:

MM. ARON Max ⁂ I.
BELLOCQ ⁂ I.
MM. FONTES ⁂ A.
GERY ⁂ A.
SCHWARTZ ⁂ I.

Chargés de cours et Agrégés:

MM. BENOIT
BLUM (Paul) O. ✲ ⁂ I.
GELMA ⁂ A.
GUNSETT ✲ ⁂ A.
HANNS ✲ ⁂ A.
HUMBERT ✲ ⁂A.
KAYSER
KELLER ⁂ A.
MM. KREISS
LARROUSSE ⁂ A.
REISS
SIMON ✲ ⁂ A.
SIMONIN ✲.
VAUCHER ⁂ A.
WEISS A.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Chargés d'un cours complémentaire:

MM. A. BOECKEL ✲, MEYER M., ROEDERER

Serment d'Hippocrate.

En présence des maîtres de cette école, de mes chers condisciples, je promets et je jure au nom de l'Être suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis resté fidèle à mes promesses! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR MERKLEN,

qui m'a constamment témoigné tant de bienveillance. Le souvenir de son enseignement magistral qui a contribué pour la plus grande part à ma formation médicale et de l'affectueux intérêt qu'il n'a cessé de me témoigner restera gravé dans mon esprit et mon cœur. Qu'il me soit permis de lui exprimer ici toute ma profonde reconnaissance et mon respectueux attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. SCHAEFFER,

qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et qui ne m'a, au cours de ce travail, ménagé ni ses conseils éclairés ni son appui bienveillant. Qu'il reçoive ici l'hommage de ma respectueuse gratitude.

A MON MAITRE
MONSIEUR LE PROFESSEUR ROHMER,

qui m'a initié à la pédiatrie. En témoignage de ma reconnaissance respectueuse et dévouée.

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG,

Avant d'exposer le résultat de ces premières recherches, poursuivies tant au laboratoire de la clinique médicale A, qu'à l'institut de physiologie, nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont apporté leur aide et ont ainsi permis la réalisation de ce travail.

Notre reconnaissance va d'abord et en premier lieu à Mademoiselle LEBRETON, près de qui nous avons toujours trouvé des enseignements précieux, ainsi que l'aide la plus efficace et la plus bienveillante. Ce travail fait partie d'un ensemble de recherches poursuivies en collaboration avec elle et Monsieur BONOT et que nous publierons ensemble ailleurs.

Nous remercions également Messieurs BONOT et DONTCHEFF, assistants à l'Institut de physiogie, qui nous ont beaucoup aidé dans l'exécution de la partie chimique de ce travail. Qu'ils soient assurés de notre cordiale reconnaissance.

INTRODUCTION

L'identification et le dosage des différents protides du sang intéressent non seulement le physiologiste, mais encore le clinicien pour qui la mise en évidence de variations constantes dans certaines affections, serait une nouvelle donnée dans l'établissement d'un diagnostic.

C'est dans cette voie et avec cette espérance que de nombreuses recherches ont été entreprises ces derniers temps; malheureusement, dans ce domaine comme dans beaucoup d'autres, les faits pathologiques ont devancé les connaissances physiologiques sans lesquelles aucune application clinique ne peut se faire d'une façon fructueuse.

Quand on aborde l'étude des protides sanguins, on se trouve en face d'une documentation abondante, sur leur origine, leurs fonctions et leurs propriétés. Loin d'être d'accord quant aux résultats obtenus, les auteurs nous mettent au contraire en présence de controverses, desquelles il semble difficile de tirer une conclusion nette. Il en est ainsi en ce qui concerne la caractérisation et le dosage de la sérumalbumine et de la sérumglobuline, question sur laquelle nous nous étendrons plus longuement au cours de ce travail.

Passons rapidement en revue les premières recherches sur les constituants du plasma.

Les anciens auteurs (PANUM 206) constatent qu'en acidifiant du sérum dilué ils obtiennent un précipité que SCHMIDT (263-264-265), dénomma globuline parce qu'il le supposait venir des globules blancs.

KUHNE (164a), HEYNSIUS (134a), HAMMARSTEN (144), s'attachent uniquement à la séparation de la sérumglobuline et de la sérumalbumine. C'est HAMMARSTEN qui montre la propriété qu'a le sulfate de magnésium à saturation de précipiter complètement

la globuline. POHL (230) étudie la précipitation par le sulfate d'ammonium.

Avec PATEIN (207) la question s'élargit et se complique de nouvelles données: il scinde la globuline en deux fractions. FREUND et JOACHIM (84), PORGES et SPIRO (232) étudient également la séparation de la globuline en euglobuline et en pseudoglobuline, et par de légères variations des procédés de salification employés, ils arrivent à obtenir plusieurs corps voisins, mais sensiblement différents de l'euglobuline et de la pseudoglobuline. Pour la sérumalbumine il en est de même: elle peut être fractionnée en plusieurs constituants, deux pour certains auteurs, trois pour d'autres (113).

Mais tous ces fractionnements: séparation de la sérumalbumine et de la sérumglobuline ou décomposition de ces deux substances, reposent uniquement sur la précipitation par des solutions salines de concentration variable; et l'ont peut se demander si les portions isolées sont de véritables individualités chimiques ou si, au contraire, ce sont des complexes en perpétuel état de renouvellement, que des séparations brutales scindent en parties variables qualitativement et quantitativement.

C'est pour répondre à ces questions que l'étude de la composition chimique des protéines a été entreprise. On a étudié la composition élémentaire en carbone, azote, hydrogène, oxygène et phosphore, on a tenté d'identifier et de doser les acides aminés entrant dans la composition des différentes protéines isolées. Malgré de nombreuses difficultés techniques on a pu mettre en évidence certaines différences dans la composition élémentaire de la sérumalbumine et de la sérumglobuline. Mais il est bon de faire observer que le mode d'obtention par adjonction d'électrolytes, d'alcool ou d'acétone, ou la purification plus ou moins poussée des produits obtenus ne sont pas sans influencer le résultat final.

Les connaissances, actuellement imparfaites, sur le mode et le lieu de formation des différents protides dans l'organisme n'apportent au sujet de la pluralité de ces derniers que peu de renseignements nouveaux.

Au début de toutes ces recherches, on s'est peu préoccupé de l'influence du milieu servant de point de départ à toutes ces extractions : à savoir le sérum. Le sérum, comme tout liquide biologique n'étant pas une solution de corps purs, de composition constante, mais un mélange de complexes, les variations de certains de ses constituants n'ont-elles pas une influence sur le taux apparent des protides et les changements de composition n'interviennent-ils pas pour fausser le mécanisme de la précipitation de ces protides par les agents les plus communément employés?

On comprend que la réponse à donner à ces questions, suppose une connaissance approfondie de la physiologie et de la biochimie des protides sériques. L'étude très poussée ces temps derniers, tant en France qu'à l'étranger, de la néphrose lipoïdique a justement fait penser à l'existence d'une interrelation possible entre protides et lipides ; elle a attiré l'attention sur les variations de précipitabilité de ces protides suivant la concentration des lipides dans le sérum.

Le présent travail a été entrepris dans l'espoir d'apporter une contribution à l'étude des complexes lipido-protidiques du sérum et de leur influence sur le dosage de la sérine et de la globuline dans les cas normaux et pathologiques.

ÉTAT ACTUEL DE NOS CONNAISSANCES SUR LES PROTIDES SANGUINS.

Sous la dénomination de protides on comprend actuellement toutes les substances appelées autrefois protéines ou albumines.

Le plasma tient normalement en solution une très forte proportion de protides: 70 à 80 grammes par litre chez l'homme. Ces substances se répartissent classiquement en 3 groupes:

Fibrinogène;

Sérumglobuline;

Sérumalbumine ou Sérine.

Un quatrième groupe a été récemment décrit par M. PIETTRE sous le nom de *Myxoprotéine*.

La sérumalbumine et la sérumglobuline sont pour certains auteurs subdivisibles elles-mêmes en plusieurs autres fractions de propriétés physico-chimiques différentes. Le taux de ces protides est sensiblement fixe pour le sang d'une même espèce animale et oscille pour l'homme autour des chiffres suivants:

Fibrinogène	1,8 0/00
Sérumalbumine	40 0/00
Sérumglobuline	28 0/00

Le taux normal de la Myxoprotéine est encore mal connu. Le fibrinogène se trouve donc en faible quantité en regard de la sérine et de la globuline, et cette dernière existe dans le plasma à un taux normalement plus faible que celui de la sérine.

Quelles sont les propriétés respectives de ces différents protides, leur origine, leur rôle dans l'organisme; la division en fibrinogène, sérine, globuline, correspond-elle à une réalité ou bien au contraire se trouve-t-on en présence d'une scission purement artificielle, correspondant à la nature du précipitant? Telles sont les questions que l'on peut se poser.

Fibrinogène.

Le fibrinogène est une globuline qui coagule entre 52 et 56°. Les solutions de fibrinogène sont en partie précipitées à la température ordinaire par addition d'une solution à 15% de chlorure de sodium et elles le sont totalement par le chlorure de sodium à saturation.

La teneur du sérum en fibrinogène peut varier normalement entre 1 et 4 0 00. Mais, dans certaines affections, le taux peut s'élever jusqu'à 15 0 00. C'est certainement le plus variable des protides du sérum.

Le fibrinogène donne naissance, par dédoublement semble-t-il, à la fibrine et à la fibrine-globuline. Si l'on bat en effet avec une baguette de verre, du sang fraîchement recueilli, on obtient une masse blanchâtre, opaque, élastique, filamenteuse, adhérente à l'agitateur : c'est la fibrine. Elle est insoluble dans l'eau, très peu soluble dans les solutions salines étendues. Mais elle se dissout très bien dans une solution de fluorure de sodium à 1% ou de chlorure de sodium à 10%. Elle est précipitée de ses solutions par le chlorure de sodium à saturation et par le sulfate de magnésie à saturation. Elle appartient donc au groupe des globulines. La composition élémentaire en carbone, hydrogène, oxygène, soufre et azote, est sensiblement analogue pour le fibrinogène et la fibrine, d'après Hammarsten (115).

	C%	H%	N%	S%	O%
Fibrinogène	52,93	6,90	16,66	1,25	22,26
Fibrine	52,68	6,83	16,91	1,10	22,48

Nos connaissances sur l'origine et le mode de formation du fibrinogène dans l'organisme sont assez imprécises. Son taux extrêmement variable a fait penser à une origine complètement indépendante de celle des autres protides sériques. L'ingestion d'aliments ne provoque pas de variations notables. Après une hémorragie la réparation des protides se fait dans un ordre toujours identique : fibrinogène puis globuline et sérine. On constate une augmentation du fibrinogène dans les affections avec hyperleucocytose. Dans les inflammations il y a formation de fibrino-

gène aux dépens des tissus. Pour MATHEWS (183) le fibrinogène serait formé par les organes hématopoiétiques ou par désintégration des leucocytes ou des globules rouges sans nulle participation du foie.

Il semble au contraire admis, par presque tous les auteurs, que le fibrinogène soit formé dans le foie, (FOSTER et WHIPPLE) (81), et aussi avec la participation du tractus intestinal (94). Ce qui milite en faveur de cette hypothèse c'est qu'en cas de lésions graves du foie le taux du fibrinogène diminue et que les lésions tissulaires, qui ordinairement en provoquent l'augmentation, n'amènent plus alors aucune variation. Expérimentalement NOLF a montré que chez la grenouille, l'ablation du foie entrave la régénération du fibrinogène. Enfin, il est de notion courante que les affections hépatiques s'accompagnent de troubles de la coagulation. Le fibrinogène augmente au contraire dans le sérum dans les cas où l'activité hépatique est augmentée : par exemple par l'introduction dans l'organisme de poisons hépatiques à petites doses.

SÉRUMALBUMINE OU SÉRINE.

C'est le plus abondant des protides du sérum. Il se trouve normalement, chez l'homme, à un taux plus élevé que celui de la globuline. On le rencontre également dans la plupart des liquides de l'organisme .Il traverse plus facilement la barrière rénale que la globuline, ce qui explique qu'il forme la plus grande partie de l'albumine des albuminuries.

Propriétés physiques : La sérine coagule par la chaleur à une température voisine de 75°. Elle est soluble dans l'eau, dans les solutions de sels neutres ou d'alcalis. Ses solutions salines peuvent être diluées ou dialysées longuement sans en amener la précipitation. La saturation d'une solution de sérine par le gaz carbonique n'amène également aucune précipitation.

Le chlorure de sodium ou le sulfate de magnésium à la température ordinaire ne forment avec elle aucun précipité, sauf en milieu acidifié par l'acide acétique. Le sulfate d'ammonium à saturation amène au contraire une précipitation complète.

La sérumalbumine présente un pouvoir rotatoire gauche = —63. Son point isoélectrique est de 4,7.

Composition chimique. L'analyse élémentaire donne, d'après HAMMARSTEN, les résultats suivants pour le sang de cheval:

Carbone	:	53,08
Hydrogène	:	7,1
Azote	:	15,93
Soufre	:	1,9
Oxygène	:	21,86

L'analyse des acides aminés constituants a été également faite tant qualitativement que quantitativement par ABDERHALDEN (1) et MOERNER pour le sérum de cheval:

Alanine	:	2,7
Leucine	:	20
Phénylalanine	:	3,1
Tyrosine	:	2,1
Sérine	:	0,6
Cystine	:	2,5
Proline	:	1
A. aspartique	:	3,1
A. glutamique	:	7,7

Elle ne contiendrait donc pas, d'après ces auteurs, de glycocolle, d'arginine, de lysine et d'histidine. Mais ces chiffres obtenus par l'ancienne méthode de FISCHER sont susceptibles d'importantes corrections.

Pour certains auteurs, se basant sur des différences de température de coagulation, la sérumalbumine peut être scindée en plusieurs fractions (199). Mais classiquement, en se basant sur son obtention à l'état cristallisé et en dépit des recherches récentes de SOERENSEN (271a) on continue à la considérer comme une individualité chimique.

L'isolement de la sérine se fait après élimination de la totalité des globulines. On précipite la sérine restant en solution soit par le sulfate d'ammonium à saturation, soit par l'alcool à

chaud. Nous y reviendrons plus loin à propos des méthodes de dosage.

Myxoprotéine.

M. Piettre (224-226-19) a isolé du sérum une quatrième protéine qu'il a appelée *myxoprotéine*.

On la sépare de la sérumalbumine après précipitation préalable des globulines par l'acide chlorhydrique. La solution claire alors obtenue est additionnée d'acétone. Le précipité centrifugé est redissous dans l'eau, la sérine passe en solution, la myxoprotéine reste insoluble.

La myxoprotéine se présente sous forme de gros flocons grisâtres visqueux. Le précipité se rétracte rapidement avec expulsion de sérosité et sa consistance augmente. Abandonnée à l'air, la myxoprotéine noircit rapidement. Elle est insoluble dans l'eau, mais elle est soluble dans les sels neutres : le chlorure de sodium à 9 0/00 par exemple.

Sa composition chimique semble assez fixe et surtout sa teneur en soufre, qui est constante :

Soufre	:	1,1%
Azote	:	14,6%

Elle ne contient ni phosphore ni calcium, elle retient très peu de lipides.

Il semble assez difficile d'obtenir à l'état pur la myxoprotéine, car elle entraîne assez facilement de la globuline et la séparation ultérieure du complexe ainsi formé est presque impossible. La méthode d'isolement est du reste assez imprécise, elle semble n'être que le résultat de tâtonnements.

Les auteurs qui se sont occupés de ce protide, le considèrent comme une globuline en raison de ses caractères de solubilité. En employant pour précipiter les globulines un autre moyen que celui préconisé par Arcand (19) il nous a semblé que les résultats obtenus pouvaient être améliorés quant à l'isolement de la myxoprotéine. Nous y reviendrons dans la partie originale de ce travail. En tout cas, il paraît difficile dans la majeure partie des cas, d'obtenir la myxoprotéine après précipitation de la globuline

par les sels.

Le taux normal de la myxoprotéine est d'après ACHARD et PIETTRE (13) de 7 à 10 0/00 dans le sérum de l'homme normal. ARCAND (19) cite pour ce sérum des chiffres extrêmement variables : de 3,2 à 11 0/00. Les mêmes variations étendues se sont trouvées dans le sérum de cheval : de 3,3 à 11,5 0/00.

Dans les cas pathologiques on note des variations énormes et non constantes dans les mêmes affections. On relève les chiffres de 17 0/00 dans une néphrite, 18 0/00 chez un cardiaque, 18 0/00 chez un urémique, 25 et 33 0/00 dans deux cas de pleurésie séro-fibrineuse. Dans un cas de néphrose lipoïdique (13), par contre, la myxoprotéine n'existait qu'à l'état de traces. Du reste PIETTRE écrit : «sa proportion est assez variable dans les états morbides, sans qu'on puisse encore apercevoir le sens et la signification de ses variations». Elle se rencontre également dans les épanchements pleuraux, dans le liquide d'ascite. Le taux en semble alors varier entre 5 et 10 0/00.

SÉRUMGLOBULINES.

Le sérum obtenu soit par défibrination soit par coagulation est un liquide clair qu'on peut chauffer jusqu'à 65°, sans obtenir de trouble. Il contient encore la sérumalbumine, la sérumglobuline, la fibrine-globuline et la nucléoprotéide du sérum. La fibrine-globuline apparaît pendant la coagulation du sang. Elle n'existe qu'en très petites quantités dans le sérum et peut être totalement précipitée par le chlorure de sodium à saturation. Elle possède les propriétés générales des globulines sauf sur deux points : sa température de coagulation est entre 64° et 66° et elle précipite pour une teneur en sulfate d'ammonium de 28%.

Quand on traite le plasma ou le sérum par du sulfate d'ammonium à saturation, on obtient un précipité abondant que surmonte un liquide clair. Dans ce précipité se trouvent : le corps connu autrefois sous le nom de nucléoprotéide sanguin, la fibrine-globuline, et enfin la sérumglobuline.

La sérumglobuline est difficile à définir et on ne peut tenter de le faire que d'après son comportement physico-chimique. Tous

les autres caractères permettant habituellement une définition précise : origine, structure chimique, sont en effet peu connus.

On peut considérer la sérumglobuline comme une substance insoluble ou difficilement soluble dans l'eau distillée. Elle est soluble dans les solutions étendues de sels neutres, les différents sels ayant des pouvoirs de solubilité différents. Enfin ses combinaisons avec les alcalis et les acides sont solubles dans l'eau.

Les globulines sont incomplètement précipitées par le chlorure de sodium à saturation en solution neutre, ou par dialyse et acidification. Par contre la précipitation est totale par le sulfate de magnésium à saturation ou le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

A l'état humide la globuline est une masse blanche formée de flocons très fins et qui n'est ni résistante ni élastique. A l'état sec, c'est une poudre jaunâtre, hygroscopique, quand elle a été traitée par l'acétone (Chick).

On peut faire une distinction entre différentes fractions au sein même de la globuline. En effet, quand, après avoir précipité la globuline par une solution saline, on dialyse la solution obtenue à partir de ce précipité, il n'y a qu'une fraction de la globuline qui précipite. D'après Marcus la portion restée en solution ne précipite même plus par acidification, d'où la distinction qui a été faite en globuline soluble et globuline insoluble dans l'eau distillée. D'autres auteurs ont également montré que la globuline pouvait être fractionnée : Hofmeister (135), Pick, Porges et Spiro (232), Freund et Joachim (89) ont distingué : *l'euglobuline* qui précipite par dilution, par dialyse ou par acidification ; et la *pseudoglobuline* qui ne précipite pas dans ces conditions.

Haslam (128) signale que dans le sérum de bœuf il y a deux protéines insolubles dans une solution à demi-saturée de sulfate d'ammonium et, dans une solution saturée de sulfate de magnésium : ce sont la globuline et la pseudoglobuline. Porges et Spiro isolent trois fractions : pseudoglobuline, euglobuline I et euglobuline II qui précipitent respectivement entre 30 et 37 volumes pour cent de sulfate d'ammonium saturé, 37 et 44 volu-

mes, 44 et 50 volumes. Ces auteurs ont également retrouvé ces trois fractions par des précipitations avec des solutions d'autres sels: sulfate de magnésium et de sodium, ce dernier étant employé à la température de 30°. FREUND et JOACHIM ont poussé la division encore plus loin. Pour ces auteurs la portion précipitable entre 28 et 34 volumes pour cent de sulfate d'ammonium saturé, serait la pseudoglobuline, la portion précipitable entre 36 et 44 volumes serai: l'euglobuline, en solution resteraient certaines portions que ces auteurs nomment: parapseudoglobuline et paraeuglobuline.

L'étude du pouvoir optique des globulines a montré une déviation spécifique différente de celle de la sérine et différente également pour l'euglobuline et la pseudoglobuline. PORGES et SPIRO (232) ont montré que les fractions séparées par des concentrations de sulfate d'ammonium différentes, à savoir entre 30 et 37 volumes, 37 et 44 volumes, 44 et 50 volumes avaient des constantes optiques différentes:

$= 49°$ pour la 1ere fraction
$= 41°$ " " 2me "
$= 42°$ " " 3me "

L'indice de réfraction est également caractéristique pour la globuline par rapport à la sérine, mais il est le même pour l'eu- et la pseudoglobuline.

La température de coagulation n'est pas la même que celle de la sérine sans qu'on puisse trouver de différence pour les variétés de globulines décrites. Le point isoélectique de la globuline est 5,6.

Il résulte de l'exposé ci-dessus que ces fractions de globuline n'ont malgré tout pas de limites bien nettes, ces divisions (abstraction faite du pouvoir optique) ne reposant guère que sur des caractères de précipitabilité, on est en droit de se demander si leur existence est bien réelle. Les anciens auteurs WEYL (307), DENIS (62), HOPPE-SEYLERS, en employant la précipitation par acidification, par dilution, par le gaz carbonique et par le sulfate de magnésium avaient conclu à l'unité de la globuline. Il semble donc que les résultats obtenus varient avec le mode de précipita-

tion employé. Galeotti (90) avait montré que la solubilité de la globuline dans le sulfate de magnésium et sa précipitation par ce sel ne dépendaient que de la concentration. Il lui semblait difficile d'admettre que l'on pût parler d'une précipitation fractionnée de la globuline. Pour Soerensen (271-272), ni la dialyse, ni la précipitation par le sulfate d'ammonium ne séparent complètement eu- et pseudoglobuline ; de plus ces protides n'existeraient dans le sérum qu'à l'état de combinaison et la solubilité de l'ensemble varierait suivant la prédominance de la partie soluble ou insoluble de la globuline.

Chick (51-52-53) en outre a montré que les rapports de ces deux globulines ne sont pas fixes et qu'il peut y avoir passage de l'une à l'autre. En dialysant longuement une solution de globuline il y a formation d'euglobuline aux dépens de la pseudoglobuline. L'euglobuline est une combinaison avec un phosphatide et sa formation prend fin dès que celui-ci est épuisé. En ajoutant alors une lécithine la transformation de la pseudoglobuline en euglobuline continue. Pour Chick l'euglobuline ne serait donc qu'un complexe né de l'action d'un lipide sur la pseudoglobuline.

La composition chimique de la globuline qui a été étudiée permet de poser le problème sous une autre forme et en même temps de saisir les différences de structure existant entre sérumalbumine et sérumglobuline. Hammarsten (114) a fait des analyses élémentaires de globuline de cheval obtenues par précipitation acétique du sérum dilué et reprécipitations répétées. Le produit obtenu finalement était purifié. Voici la composition trouvée :

Carbone	52,52	à	53,3
Hydrogène	6,88	à	7,13
Soufre	1,12	à	1,11
Azote	15,61	à	16,25

Porges et Spiro ont fait l'analyse élémentaire des fractions précipitées par le sulfate d'ammonium à des concentrations différentes :

Concentrations de SO4(NH4)2	C%	H%	N%	S%	C/N
30—37 vol%	52,56 à 52,68	7,65 à 7,75	16,03	1,13	3,28
37—44 vol%	50,35 à 50,48	7,72 à 7,78	15,5	0,98	3,25
44—50 vol%	47,40 à 47,52	8,01 à 8,14	14,45	0,92	3,28

Ce qui frappe c'est la constance du rapport C/N alors que les valeurs en carbone et en azote varient suivant les fractions qui ont été, préalablement à l'analyse, traitées de la même façon : lavage à l'alcool, puis à l'éther et séchage à 60°, 80° et 150°.

KIMURA (161a) a retrouvé des valeurs sensiblement analogues dans les mêmes conditions, et la même constance du rapport C/N.

La composition en acides aminés des globulines du sérum de cheval a été étudiée par ABDERHALDEN (1-5-7-6) et ses collaborateurs :

Glycocolle	3,5
Alanine	2,2
Valine	+
Leucine	18,7
Phénylalanine	3,8
Tyrosine	2,5
Cystine	1,5
Proline	2,8
A. Aspartique	2,5
A. Glutamique	8,5

Quant à la valeur de ces chiffres les mêmes réserves sont à faire que dans le cas de la sérine. On ne peut en aucun cas par

ces analyses élémentaires saisir de différences de composition entre les diverses fractions de globuline.

La recherche de la teneur en phosphore donne par contre des résultats plus précis. L'euglobuline contient en effet du phosphore alors que la pseudoglobuline n'en contient pas. HARDY (122) trouve dans l'euglobuline 0,07 à 0,08% de phosphore qui, pour cet auteur, fait partie intégrante de ce corps, alors qu'il ne trouve que 0,009% dans la pseudoglobuline. HASLAM (127) pense également que le phosphore est une partie constituante de l'euglobuline et qu'en aucun cas on ne peut le considérer comme dérivé d'une lécithine. CHICK (52) trouve des chiffres plus élevés de phosphore: 0,119 à 0,094% dans l'euglobuline de cheval. Mais quand ces mêmes globulines ont été traitées à l'éther et à l'acétone le taux tombe à 0,02%. Cette auteur conclut à une combinaison possible entre la pseudoglobuline et un lipide contenant du phosphore. Nous y reviendrons.

TROENSEGAARD et KOUDAHL (295-296), ont soutenu l'idée que la cholestérine pourrait être considérée comme un groupement prosthétique par rapport aux protides.

Peut-on, en résumé, considérer la globuline comme formée de deux fractions distinctes: euglobuline et pseudoglobuline? Les analyses chimiques, sauf en ce qui concerne le phosphore, ne sont guère en faveur de cette hypothèse et les deux expériences de CHICK rapportées ci-dessus semblent démontrer que ce phosphore n'est qu'une impureté dont on peut facilement débarrasser l'euglobuline. La différenciation purement physico-chimique ne permet pas d'affirmer qu'il s'agit bien de protides différents. MOERNER (191), HAMMARSTEN (114-117), ont de plus montré que par des manipulations simples on peut transformer une globuline soluble en une globuline insoluble et ceci sans l'intervention d'aucune action chimique. PAULI, dans le même ordre d'idée, signale qu'en débarrassant complètement le sérum d'électrolytes on a pu obtenir la séparation totale des globulines et il ne reste ainsi plus trace de globuline soluble dans l'eau.

Devant ces faits on incline à penser que le fractionnement des globulines pourrait n'être qu'un artifice, les fractions que

l'on sépare entraînent toute une série d'impuretés qui leur confèrent leurs caractères spéciaux.

État de la globuline dans le sérum.

La globuline étant insoluble dans l'eau ne peut se trouver dans le sérum que sous forme d'un complexe soluble et stable. On incline à penser que l'on se trouve en présence d'une combinaison de globuline et de sels neutres. Starke (283) cependant soutient que la globuline se comporte dans le sérum comme une combinaison avec des alcalis. Hardy a montré que le sérum pouvait dissoudre des quantités considérables de globuline et Schmidt (263-264) signale que les propriétés des solutions de globuline dans le sérum et dans le chlorure de sodium ne sont pas identiques ; cet auteur en conclut que le sérum possède des moyens de solubilisation propres. Haslam (128) indique que la présence d'albumine augmente fortement la solubilité de la globuline dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation. On peut admettre que la sérine joue effectivement un rôle stabilisant en regard d'une solution de globuline.

Les différences entre la sérine et la globuline.

Différents moyens (précipitation par les sels, par dialyse, par l'alcool) permettent de scinder les protides sanguins du plasma en *sérumalbumine* et *sérumglobuline*.

Les caractéristiques physico-chimiques et chimiques permettent de maintenir cette division. Ni la température de coagulation, ni le pouvoir rotatoire, ni le pouvoir de réfraction ne concordent. Leurs caractères de solubilité les distinguent. Au point de vue chimique il n'y a pas non plus concordance dans la teneur en crabone, hydrogène, azote et soufre. Les acides aminés qui entrent dans leur composition sont en partie différents et se trouvent à des taux variables dans ces deux fractions.

	Sérine	Globuline	Fibrine
pHi	4,7	5,6	7,2
	Composition élémentaire.		
Carbone	53,08	52,52	52,93
Hydrogène	7,1	6,88	6,90
Azote	15,93	15,61	16,66
Soufre	1,9	1,11	1,25
Oxygène	21,86		22,26
Amino-Index	13,8	20,8	

Acides amines.

Glycocolle	0	3,5
Alanine	2,7	2,2
Valine	—	+
Leucine	20	18,7
Phénylalnine	3,1	3,8
Tyrosine	2,1	2,5
Sérine	0,6	—
Cystine	2,5	1,5
Proline	1	2,8
Oxyproline	—	—
A. Aspartique	3,1	2,5
A. Glutamique	7,7	8,5
Tryptophane	+	+

Donc par les différents moyens connus de précipitation des protides du sang, on obtient deux fractions indiscutables : globuline et sérine que leurs constitutions et leurs propriétés caractérisent. Mais la différence n'est, somme toute, pas tellement accentuée qu'on ne puisse se demander si ces deux albumines ont bien une origine propre, une existence autonome ou bien, au contraire, si, leurs rapports ne sont pas étroits et si la transformation de l'une en l'autre n'est pas possible.

Relations des différentes Protéines.

Le fibrinogène, la globuline et la sérine présentent donc des caractéristiques tant physiques que chimiques assez tranchées pour en permettre une différenciation nette. Cependant l'hypothèse d'une relation de ces protides entre eux et de leur transformation réciproque a toujours préoccupé les chercheurs qui ont tenté de la confirmer ou de l'infirmer.

Il y a peu de recherches concernant le passage fibrinogène-globuline ; par contre les travaux qu'a suscités la transformation possible de la globuline en sérine sont très nombreux. Sikes a montré qu'en abandonnant de l'urine albumineuse, on observe au bout d'un certain temps une diminution de la sérine avec augmentation de la globuline. La chaleur et l'alcalinité de la solution accélèrent le phénomène. Y a-t-il transformation directe de la sérine en globuline ? Pour Petschacher (212) il y aurait dégradation progressive de la structure des molécules. Outre le vieillissement, d'autres facteurs physiques ont le même effet : (57) chaleur, agitation, irradiation aux rayons X et ultra-violets. Starke (284) ayant rendu du sérum de poule incoagulable par dilution au 1/10 et le dialysant pendant 14 jours à 56° en maintenant une réaction alcaline faible et une teneur en sels également faible, a constaté une transformation de sérine en globuline. Moll (189) a eu les mêmes résultats. Tous les sérums de lapins qu'il a étudiés, portés à 56° pendant une heure après alcalinisation montrent une diminution de la sérine avec augmentation concomitante de la pseudoglobuline et de l'euglobuline sans formation d'alcalialbumines. La transformation se ferait donc ainsi pour Moll : *Albumine, Pseudoglobuline, Euglobuline.* Il suffit de porter le sérum sanguin à 56° pendant une heure et demie pour avoir les mêmes résultats. Ruppel a confirmé le fait (252). La durée du chauffage n'augmente pas la quantité de globuline néo-formée ; au contraire : du sérum de mouton porté à 56° pendant 15 minutes donne une transformation de 28% de la sérine, alors qu'en 30 minutes on obtient un effet beaucoup moindre (161). La putréfaction donne les mêmes résultats. D'a-

près RUSNYAK toutes ces modifications sont irréversibles (253). Donc tout ce qui amène un changement des colloïdes : (le chauffage, l'exposition aux rayons X ou ultraviolets), amène une augmentation de la viscosité et de la précipitabilité par le sulfate d'ammonium, et par cela même une augmentation du taux des globulines : pour le sérum de cheval frais le taux de la globuline étant de 22,1 0/00 passe à 31,5 0/00 après vieillissement (22).

Comment a-t-on caractérisé la globuline ainsi obtenue ? On s'est adressé en premier lieu aux caractères de précipitabilité par les sels. Pour JOACHIM (156)-STARKE (283)-HERZFELD (132), le corps obtenu a les mêmes limites de précipitabilité que la globuline préexistante. STARKE a de plus montré que la solubilité dans l'eau, les sels neutres, les bases et les acides sont les mêmes pour les deux globulines. MOLL (189) voit la preuve de l'identité de la globuline naturelle et de la globuline artificiellement obtenue dans les faits suivants : elles ont les mêmes limites de précipitation saline, la même diffusibilité et la même teneur en soufre.

Pour d'autres auteurs au contraire, il n'y a pas apparition de globuline véritable, mais un changement des limites de précipitabilité des albumines. HAMMARSTEN (114) pense que les propriétés de précipitabilité et de solubilité ne peuvent faire une discrimination entre les protéines puisqu'elles ne correspondent pas aux propriétés chimiques. Il semble également impossible à ce même auteur d'obtenir de la globuline contenant du glycocolle à partir de sérine n'en contenant pas ; et l'on ne peut que se rallier à une telle opinion. BYWATERS et TASKER-DOUGLAS (48a) ont dosé le soufre, les hydrates de carbone et le phosphore dans la globuline obtenue artificiellement. Ils ont trouvé des valeurs se rapprochant plus de la sérine que de la globuline vraie. Par des études réfractométriques, HAFNER (111) a prouvé que le changement survenu dans le sérum chauffé ne pouvait être considéré comme une apparition de globuline véritable. FANCONI (75) fait intervenir un argument d'ordre sérologique : des animaux préparés avec de la globuline vraie ne présentent aucune réaction après injection de globuline artificielle. Au contraire préalablement sen-

sibilisés à la globuline artificielle les animaux présentent une réaction après injection de sérine.

En résumé on peut dire que par certains artifices on a pu obtenir l'apparition de corps ayant les caractères physiques de la globuline (107) sans que l'on puisse trancher d'une manière définitive la question de savoir si ce sont bien des globulines qui apparaissent ainsi ou de simples dérivés de la sérine. Le fait à retenir est celui-ci: il peut sous diverses influences se produire dans le sérum une modification des caractères de précipitabilité des différentes protéines et par suite apparaître une variation du taux respectif de ces protéines.

***

Relations entre les Protides sanguins et les Lipides.

Depuis bien longtemps les expérimentateurs ont été frappés par l'aspect spécial que prend à certains moments le plasma sanguin; quand on le recueille six heures après un repas riche en graisses, ou bien encore dans certains états pathologiques, il se présente comme une émulsion fine et après centrifugation énergique on voit remonter à la surface une couche analogue à celle observée en centrifugeant du lait. Les substances séparées sont aussi des graisses et le plasma qui les fournit est dit «lipémique» ou «hyperlipémique». Mais il existe, à côté de cela, des cas où le dosage révèle dans un plasma ou un sérum, apparaissant comme optiquement vides, des quantités fort importantes de graisses. Cet état peut se rencontrer aussi bien en pathologie humaine qu'à l'état normal chez certaines espèces animales. Dans les cas de néphrose lipoïdique chez l'homme, dans le sérum d'animaux comme l'anguille, on peut trouver 20 à 30 gr de lipides par litre et 6 à7 gr. de cholestérine, sans observer la moindre opalescence. Les lipides et les stérols, corps totalement insolubles dans l'eau, doivent donc se trouver ici dans un état physico-chimique tout à fait particulier, qui augmente leur hydrohilie et les dissimule. Cette intéressante question qui touche à de nom-

breux problèmes de physiologie générale a été récemment reprise par MACHEBOEUF (181-182). Cet auteur ayant isolé à partir du sérum des complexes lipido-protidiques, pense qu'à l'état naturel il existerait des combinaisons analogues, tant dans le sérum que dans le protoplasme, et que la limpidité des sérums riches en lipides est suffisamment expliquée par leur solubilité. Il a rapproché les corps, qu'il a préparés par précipitations successives, des «gliodes» de BOTTAZZI.

Considérée du point de vue spécial de l'étude biochimique du sang, la question des liaisons existant entre protides et lipides sériques n'est pas neuve. H. CHICK, dès 1914, a tenté d'expliquer les différences de constitution entre euglobuline et pseudoglobuline et le passage de ces formes de l'une à l'autre, en démontrant que l'euglobuline n'était qu'un complexe né de l'union de la pseudoglobuline et d'un phosphoaminolipide. CHICK (51-52-53) commençait par précipiter l'euglobuline du sérum par le sulfate d'ammonium au tiers, puis la pseudoglobuline en réalisant dans le filtrat une demi-saturation par le sulfate d'ammonium. La pseudoglobuline, remise en solution, abandonne toujours au cours de la purification (dialyse par exemple) une certaine quantité d'un protide insoluble qui se présente avec tous les caractères de l'euglobuline. Ce protide contient toujours une certaine quantité de phosphoaminolipide (lécithine). Lorsque la formation de cette euglobuline a cessé, si on veut doser le phosphore présent on s'aperçoit qu'il n'y en a plus. Si on réajoute dans le milieu une certaine quantité de lécithine, la formation d'euglobuline aux dépens de la pseudoglobuline recommence ; elle cesse lorsque toute la lécithine présente a été utilisée. Les constatations de CHICK sont en accord sur plus d'un point avec les observations antérieurement faites par HARTLEY, HASLAM et d'autres expérimentateurs.

HANDOVSKY (44a-120a), en 1925, a publié avec une série de collaborateurs des études au sujet des liaisons protides-lipides. Si on précipite un sérum à chaud en milieu acidulé par l'acide acétique ou par le sulfate d'ammonium à saturation, la totalité des phosphatides passe dans le filtrat ainsi que 70 à 80% de la

cholestérine. Si la globuline est précipitée seule par un moyen approprié, elle n'entraîne que 20 à 30% de la cholestérine présente dans le milieu. HANDOVSKY en conclut que les phosphatides ne forment pas avec les lipides des complexes bien étroits et que ce qu'il y a de caractéristique dans les associations lipides-protides c'est la combinaison globuline-cholestérine. Pour le reste des lipides HANDOVSKY pense que phosphatides et stérols sont associés non à des lipides, mais entre eux. L'auteur et ses collaborateurs se sont surtout servis pour étayer leur thèse de la détermination des quantités de cholestérine susceptibles d'être directement extraites des sérums par simple agitation à l'éther. HANDOVSKY a fixé les limites de température et de durée dans lesquelles cette méthode peut être employée sans entraîner la précipitation et la dénaturation des protides et entre lesquelles elle peut renseigner sur le «degré de liaison» entre stérols et globuline.. Plus il y a d'euglobuline dans un sérum, moins on peut extraire de cholestérine par l'éther, plus il y a de sérine, plus les complexes lipidoprotidiques sont lâches. Les phosphoaminolipides étant plus lyophiles que la cholestérine et ses éthers, ne passent pas dans l'éther quand on emploie ce test d'extraction. La réaction donnée au sérum, son état de dilution ou de concentration, la présence de tels ou tels électrolytes (NaCl, KCl, Ca Cl^2) ou non électrolytes (glucose), influent considérablement sur les quantités de cholestérine qu'on peut extraire. Ainsi se trouve mis en évidence l'effet de tous ces facteurs sur la structure micellaire des corps présents dans le milieu.

Les études d'HANDOVSKY et de ses collaborateurs très peu poussées du point de vue chimique sont dans l'ensemble assez décevantes si l'on considère le peu de fécondité des conclusions auxquelles elles les ont conduits.

FRANKENTHAL (81a) en 1925 a fractionné les protides du sérum par électrodialyse et admet que la majeure partie des lipides précipite avec les globulines. Dans les sérums à Wassermann positif les lipides accompagneraient au contraire la sérine. Cette constatation est en accord avec les faits signalés par TROENSEGAARD et KOUDAHL (295). Pour RIZZATTI, au contraire, la plus grande

partie de la cholestérine accompagnerait la sérine quand le Wassermann est négatif.

Le travail le plus étendu et le plus complet sur la liaison protides-stérols est celui de GARDNER et GAINSBOUGH (90a). Ils ont dosé, après plusieurs précipitations salines de la sérine, de la pseudoglobuline et de l'euglobuline, les quantités de stérols libres et combinés qu'entraînent ces trois protides. Ils ont trouvé que 13,8% de la cholestérine totale était liée à l'euglobuline, 1,03% à la pseudoglobuline et 1,5% à la sérine. De la cholestérine libre retenue il y a 90,34% dans l'euglobuline

2,64% '' la pseudoglobuline

7,00% '' la sérine

Des éthers de la choléstérine retenus il y a

82,4% dans l'euglobuline

6,5% '' la pseudoglobuline

11,5% '' la sérine.

Pour 1 gr. d'euglobuline précipitée on a 16,6 mmgr. de cholestérine totale.

Signalons également le travail de ARND et HAFNER (20) qui, se basant sur des mesures de réfraction spécifique, émettent l'hypothèse que dans la sérine, la lécithine serait engagée dans un complexe avec les protides.

Les récentes recherches de MACHEBOEUF (181-182) ont apporté, sur la question des complexes lipo-protidiques, des précisions dont l'intérêt dépasse de beaucoup celui des travaux relatés ci-dessus. Nous allons résumer rapidement les travaux de cet auteur. Ayant d'abord préparé par précipitation au sulfate d'ammonium les globulines du sérum de cheval, il a pu à l'aide de précipitations successives à pH 3,8 préparer un complexe qui contient pour 59 de protides, 22 de phosphatides et 17,9 d'éthers de la cholestérine. A partir de la sixième précipitation, la constitution de ce complexe reste constante. Par litre de sérum de cheval il y aurait 2,5 gr, de ce complexe dont voici les principales propriétés physico-chimiques.

1°) ce complexe agité avec de l'éther ne lui cède rien, quel que soit le pH du milieu (celui-ci restant entre 6,98 et 9) alors

qu'une émulsion artificielle de lécithine additionnée d'éthers de la cholestérine dans une solution de sérine, cède une grande partie de ses lipides à l'éther. L'existence de liaisons lipides-protides explique la différence de comportement dans les deux cas;

2°) les solutions légèrement alcalines et diluées de ce complexe peuvent être additionnées de 20 fois leur volume d'alcool à 95° sans donner de précipité. Si on verse l'alcool peu à peu il se forme au début un précipité qui se redissout. Il n'y a de précipitation définitive des protides que lorsque la concentration en alcool réalisée dans le milieu ou la température sont telles que les complexes lipido-protidiques sont définitivement détruits. La solubilité de la sérine dans l'alcool (1,75 gr 0/00 dans l'alcool à 87° et pH = 9) montre que la sérine est dans un état spécial.

3°) le complexe sérine-lécithine-cholestérine peut donner un gel limpide à l'ultra microscope même lorsque la concentration en lipides atteint 100 0/00. De cet ensemble de faits l'auteur conclut que la limpidité parfaite des sérums s'explique par l'existence de complexes sérine-lipides ayant une grande affinité pour l'eau, et dont l'état d'équilibre est sensible aux électrolytes présents et au pH.

Soerensen (271a), tout en reconnaissant l'intérêt des recherches de Macheboeuf, a fait quelques objections à ses conceptions. La principale est la suivante: quand on traite à froid le sérum par l'alcool, il n'y a pas dénaturation, mais seulement précipitation des protides. Or dans le précipité on ne trouve pas une quantité de phosphore suffisante pour que le complexe de Macheboeuf se soit trouvé précipité avec les protides et d'autre part, dans le filtrat on trouve bien de la lécithine, mais pas de protides. Donc la précipitation alcoolique aurait rompu les complexes dont l'existence est invoquée par Macheboeuf. Les liaisons lipides-protides seraient donc très lâches. Cette objection est-elle convaincante? Il est démontré que l'alcool durant un court contact à froid (0°) ne dénature pas les protides, mais son action coagulante peut évidemment trouver son explication dans le fait qu'en déshydratant les protides il rompt leur liaison avec les protides du milieu. Lorsque Macheboeuf traite son complexe par l'alcool

sans le détruire, les conditions de concentration et de pH réalisées dans le milieu sont bien particulières. D'autre part SOERENSEN pense que le complexe sérine-lécithine-cholestérine isolé par MACHEBOEUF pourrait être artificiellement formé par adsorption, au moment de la précipitation initiale. Nous préférons penser avec MACHEBOEUF qu'il préexiste vraiment, les preuves apportées par l'auteur semblant suffisantes, mais qu'il est loin de représenter la totalité des complexes lipido-protidiques du plasma sanguin. Dans une note récente MACHEBOEUF revient sur l'idée que les complexes lipidiques se feraient toujours avec la sérine, alors que rien n'exclut la possibilité de liaisons avec les globulines comme le pensent CHICK, HANDOVSKY, GARDNER et GAINSBOROUGH etc.. Nos propres recherches, comme on le verra plus loin, nous obligent à nous rallier sur certains points à l'opinion de ces auteurs.

*
* *

ORIGINE DES PROTIDES DU SANG.

La composition et le taux des différents protides du sang semblent être assez caractéristiques de l'espèce animale envisagée? Comment prennent naissance ces protides? Quel est leur lieu d'origine dans l'organisme? A ce sujet nos connaissances demeurent incertaines et demanderaient à être précisées. L'hypothèse émise en premier lieu est celle de l'origine alimentaire des protides. Il a été en effet observé que chez le veau nouveau-né le sérum se trouve dépourvu d'euglobuline et de pseudoglobuline, celles-ci apparaîssent seulement après ingestion d'aliments qui les contiennent (45-139-142-146), ce qui semble indiquer la participation d'un apport extérieur. Chez le tout jeune enfant également, la quantité de protides est plus faible que chez l'adulte et la proportion des divers constituants augmente avec l'âge.

Expérimentalement on a étudié l'influence du jeûne suivi de réalimentation chez les animaux adultes. . Les résultats semblent différer avec les espèces envisagées. Chez le chien, le rat, on observe pendant le jeûne une élévation de la paraglobuline avec diminution de la sérine et augmentation du fibrinogène. Chez le

lapin, le bœuf, le cheval, il y a augmentation de la sérine par rapport à la globuline. GITHENS (92), ayant étudié l'influence du jeûne et de la réalimentation sur le taux des protides du sérum de chien, est arrivé aux conclusions suivantes: 1°) l'augmentation de la sérine peut être considérée comme dûe à l'apport d'albumines par les aliments; 2°) le fibrinogène se répare moins bien que la sérine, ce qui est en faveur d'une origine indépendante; 3°) quant aux globulines, elles subissent pendant la durée du jeûne une augmentation difficilement explicable. On peut penser qu'elles proviennent d'une transformation de la sérine qui à ce moment diminue. Pour MORAWITZ (190) la sérine se reforme rapidement dès que le jeûne cesse. Pour ABDERHALDEN et SAMUELY (5) il n'y a aucun rapport entre les variations du taux des protides et la nourriture. Si en effet on fait absorber de grandes quantités de gliadine on ne trouve aucune augmentation de la teneur en acide glutamique. Il est bon de faire remarquer également que chez le veau nouveau-né l'augmentation rapide des globulines après apport alimentaire est suivi de chute lente tout comme si l'organisme tentait de se débarrasser d'un protide considéré comme étranger. BURCKHARDT (48)- WALLERSTEIN - LEWINSKI (167a) ont vu la sérine augmenter rapidement après la saignée. Le fibrinogène serait plus difficilement renouvelable.

Pour MICHAILOW globuline et sérine prendraient naissance par la décomposition d'un groupe albumineux complexe du plasma. HARDY (122) se range à cette idée. Pour d'autres auteurs il y a passage d'une forme à l'autre. Pour RODRIGUEZ (244a) la filiation est la suivante: *albumine, globuline*. . . HERZFELD et KLINGER (132) ont émis une hypothèse quant à l'origine et à l'interrelation des protides. Pour ces auteurs les fractions séparées par les solutions salines à différentes concentrations n'ont pas d'individualité chimique. Il existe une série de relations entre les particules colloïdales de différents degrés de dispersion avec possibilité de passage de l'une à l'autre. L'évolution se ferait à partir du fibrinogène qui résulterait de la désintégration des protides cellulaires, pour aboutir aux substances non coagulables en passant par les albumines. Les particules de protéines

sont stabilisées par des protides de désintégration inférieurs, tels les amino-acides et les polypeptides.

L'hypothèse est évidemment peu vérifiable expérimentalement, et la transformation du fibrinogène en globuline reste sujette à caution. Pour REYMANN (239a) la globine des globules rouges serait l'origine d'une partie des protides. Il semble certain que dans le processus d'immunisation, la formation d'antitoxine s'accompagne d'une diminution de l'hémoglobine et du nombre des érythrocytes, mais par contre le fibrinogène augmente et postérieurement la globuline; la sérine au contraire diminue. On doit faire remarquer que l'hémoglobine a des limites de précipitation peu nettes et chez le cheval, en particulier, cette dernière serait précipitée avec la pseudoglobuline dans le sérum hémolysé.

Il est difficile d'acquérir des données expérimentales sur l'origine et les variations du taux des protides étant donné que les résultats trouvés pour une espèce animale peuvent ne pas s'appliquer à une autre et que les variations physiologiques peuvent avoir une étendue plus ou moins grande suivant l'animal envisagé. Cependant si certains auteurs comme REYMANN, HERZFELD et KLINGER soutiennent l'idée d'une origine commune et de la transformation réciproque des protides, d'autres comme WHIPPLE (308-309) et ses collaborateurs pensent plutôt à une origine indépendante et à un lieu de formation distinct. Pour ces auteurs ce lieu serait le foie et peut-être d'autres tissus, mais le mode de formation serait différent pour le fibrinogène, la sérine et la globuline. La régénération de ces deux dernières protéines semble pouvoir se faire pendant le jeûne, mais elle est incontestablement stimulée par l'ingestion d'aliments. La difficulté relative de cette régénération, que l'on observe après un abaissement notable du taux physiologique, semble prouver que normalement l'usure des différents protides doit être faible. Pour certains auteurs le foie même n'est pas indispensable: la fistule d'Eck n'entrave en rien la régénération. ABDERHALDEN (3-5) pense à une action synthétique de la paroi intestinale. GOTTSCHALK et NONNENBRUCH (96) expriment l'idée d'une formation par les tissus: chez la grenouille l'extirpation du foie n'amène aucun trouble de la régénération,

même quand le taux a été au préalable fortement abaissé dans le sérum. De plus la teneur en acides aminés est sensiblement la même dans le système porte et les veines sus-hépatiques pendant la digestion.

Le mécanisme qui maintient constant le taux des protides chez l'adulte est inconnu. Le jeune animal a un taux plus faible et une répartition différente de ses protides. Au cours de son développement on assiste à une augmentation des albumines totales avec remaniement du rapport sérine/globuline. Dans les infections il y a habituellement augmentation du fibrinogène et de la globuline. Le fibrinogène retourne rapidement à la normale, mais l'augmentation des globulines peut persister, c'est pourquoi Howe (138) propose de considérer l'accroissement des globulines observé chez l'adulte par rapport au jeune, comme le résultat d'infections successives subies par l'individu.

En résumé les divers protides auraient un lieu de formation différent. Le mécanisme qui tend à maintenir constant le taux de ces protides est inconnu et l'organisme répond aux infections par une augmentation du fibrinogène et de la globuline, ce qui pourrait dans une certaine mesure expliquer les variations de cette dernière au cours du développement.

***

Fonctions des Protides du Sérum.

Le rôle du fibrinogène semble être le mieux établi. Son action sur l'arrêt des hémorragies est bien connu (80-81). Dans les inflammations aiguës il y a formation de fibrinogène. Normalement il y a une destruction constante faible du fibrinogène, tandis qu'au cours des hémorragies, des inflammations, il y a accroissement de sa production.

On a primitivement attribué à la sérine et à la globuline la fonction d'apporter aux tissus la nourriture azotée dont ceux-ci ont besoin. Cela nécessiterait, soit l'absorption directe des albumines alimentaires par l'intestin, soit la synthèse à partir des produits de la digestion par l'intestin ou par le foie. Or l'absorption

directe n'existe pas, quant à la synthèse, on n'a aucune preuve convaincante de sa réalité. La lenteur relative de la réparation des protéines après un fort abaissement de leur taux dans le sérum semblerait prouver que leur fonction nutritive n'est pas primordiale. Les acides aminés augmentant dans le sang après les repas, il semble que la nutrition cellulaire se fasse à leurs dépens, sans une nouvelle synthèse derrière la barrière intestinale.

Les protides sériques interviennent dans le degré d'hydratation des tissus (27-69-198-219). Un accroissement de leur viscosité et de leur imbibition tend à créer une rétention aqueuse, tandis que la diminution de la viscosité est suivie d'une perte d'eau. Les changements de la teneur en eau dans les tissus de l'organisme peuvent ête le résultat d'une augmentation du taux des albumines totales du sang ou bien du degré d'imbibition de ces albumines (301). Govaerts (97-98-99-100-101) a vu la pression osmotique des protides sanguins diminuer en cas d'œdèmes cardiaques ou rénaux (73). Il est bon de faire remarquer que cette action n'est peut-être qu'indirecte. En effet, les protides se comportent dans le sérum comme des acides (le pH sérique étant normalement très alcalin par rapport au point isoélectrique des protides) et s'unissent aux cations et particulièrement au sodium. Il se produit, entre le plasma et le liquide interstitiel des cellules, un équilibre de Donnan, la paroi des capillaires jouant le rôle de membrane sémi-perméable. L'œdème peut alors se produire par augmentation du taux du sodium dans le plasma, d'où diminution de l'appel d'eau et de sodium des tissus vers le plasma, ou bien par diminution du taux des albumines totales, ce qui déplace l'équilibre de Donnan dans le même sens. Dans les deux cas il y a rétention de NaCl dans les tissus, d'où œdèmes: Grabar et Weill (102), Blum et Grabar (33) ont observé des chutes de pression osmotique par apport de chlorure de sodium ou de bicarbonate de soude.

On a beaucoup discuté sur le rôle des différents protides dans les phénomènes d'immunité. En effet, quand on immunise un animal, on observe toujours une augmentation du taux de la globuline dans son sérum. Mais nous laisserons toutes les questions

soulevées par le problème de l'immunité en dehors du cadre de cet exposé.

La vie cellulaire est également influencée par le taux des protides sanguins. Chez le chien la saignée avec réintroduction de globules rouges en suspension dans du liquide de Locke, aboutit à un choc mortel. Si au contraire le liquide injecté contient des protides à un taux voisin de la normale il n'y a aucun choc. Une diminution modérée du taux des protides ne conduit à aucune complication; par contre, si simultanément les cellules hépatiques sont altérées artificiellement, l'animal peut faire un choc grave. Pour WHIPPLE et ses collaborateurs les protéines auraient donc un rôle stabilisateur vis-à-vis des cellules de l'organisme et l'intégrité du foie influencerait la production des chocs.

Nous ne pouvons nous étendre ici plus longuement sur le rôle multiple des protides sanguins, ce qui nous entraînerait à un exposé sans rapport direct avec nos recherches personnelles.

Variations quantitatives des Protides du Sérum sanguin a l'état normal et pathologique.

Starlinger et Winands (290) donnent comme chiffres normaux chez l'homme par litre de plasma:

		Moyenne
Albumine totale	69,3 à 91,3	80,3
Fibrinogène	2,2 à 3,6	2,9
Globuline	14,1 à 40,3	27,5
Sérine	42,1 à 57,8	49,9

ce qui donne pour 100 gr. d'albumine et en valeur moyenne:

Fibrinogène	3%
Globuline	34%
Sérine	63%

D'autres auteurs donnent comme normaux des chiffres un peu différents:

Albumine totale	73,3 0/00
Fibrinogène	1,8 0/00
Sérine	38,5 0/00
Globuline	33,0 0/00

Dans le sérum les chiffres sont un peu différents de ceux du plasma. Cependant cette différence disparaît si l'on a soin de recueillir le sang sous huile de paraffine, ce qui évite les variations de teneur en acide carbonique (Frey).

Les teneurs en protides du sang des animaux sont différentes de celles de l'homme ; on a trouvé chez le bœuf les chiffres moyens suivants par litre de plasma.

Albumine totale	66,8 0/00
Pseudoglobuline	15,4 0/00
Euglobuline	12 0/00
Sérine	39 0/00
pour le cheval :	
Albumine totale	71,4 0/00
Globuline	25,6 0/00
Sérine	33,8 0/00

Le taux des différents protides a été également recherché dans le liquide tissulaire. Si on perfuse des organes avec du sérum physiologique, celui-ci se charge en protides dont on peut considérer finalement le taux comme étant égal à celui des protides du liquide tissulaire grâce à l'établissement d'un équilibre. GUTZEIT (107-108) a ainsi pu mettre en évidence une prédominance de la globuline dans le foie et le rein.

BLEYER et BERGER (41) ont pu séparer par le sulfate d'ammonium une globuline et une albumine dans les différents tissus. Dans le muscle il y a prédominance de l'albumine, tandis que dans le foie, le rein, c'est la globuline qui prédomine.

Quotient protéique ou albumineux. — On nomme ainsi le rapport *sérine/globuline*. Ce rapport est normalement au-dessus de 1 chez l'homme (HOFFMANN). HAMMARSTEN donne comme chiffre normal 1,5 — LEWINSKI 1,4 — EPSTEIN 1,6 — ADLER et STRAUSS 1,5 — SALVESEN 1,7.

Chez les animaux les valeurs sont variables avec l'espèce envisagée. Le quotient est plus bas chez certains animaux :

Cheval	0,6
Bœuf	0,8
Tortue	0,7
Anguille	0,3
Grenouille	0,2

Il est analogue à celui de l'homme pour d'autres espèces :

Porc	1,5
Chien	1,5

ou beaucoup plus élevé. C'est le cas pour :

Pigeon	2,8
Lapin	2,4
Rat	2,9

Les variations chez un même individu ne dépasseraient pas 10% (Adler 16). La saignée avec réinjection des globules rouges reste sans influence.

Taux des protides dans les liquides pathologiques. — Dans les différents liquides pathologiques se rencontrent également de la sérine et de la globuline ainsi que de la myxoprotéine. Dans les ascites la teneur en albumines totales est moindre que dans le sang mais le rapport albumineux est analogue ou légèrement plus élevé. Pour Joachim (156) les exsudats auraient une teneur en euglobuline plus forte que les transsudtas. Dans les ascites néoplasiqus l'albumine serait très augmentée par rapport à la globuline, cas contraire à celui des autres ascites. Dans les albuminuries il y a présence d'albumine et de globuline et l'on trouve rarement l'un sans l'autre. En général il y a 1/3 de globuline, le reste est formé de sérine. Dans les cas d'amylose il y a augmentation du pourcentage de la globuline.

Variations physiologiques. — Pour Lewinski (167a) Woosley la teneur du sérum en protéines est constante à l'état normal et caractéristique de l'espèce. Nous avons déjà vu que l'inanition chez le chien produisait une légère augmentation de la globuline, avec diminution de la sérine et de la fibrine. L'alimentation n'a que peu d'influence sur le taux des différents protides. Le froid provoque selon Howe une augmentation de la sérine. Dans la grossesse on assiste au contraire à une augmentation de la globuline (55). Morawitz (190) a vu dans l'hémorragie une augmentation de la sérine et ensuite une augmentation de la globuline. Les rayons X à forte dose provoquent une déviation du rapport *sérine/globuline* en faveur des globulines avec augmentaion de l'albumine totale.

Variations pathologiques. — Au cours des divers états infectieux il y a des variations des taux respectifs des protides sanguins. On peut dire qu'il y a, d'une façon générale, dans toutes les maladies infectieuses, une augmentation de la globuline aux dépens de la sérine (34-37-38-69a-179-262-290).

Dans le choc anaphylactique on observe chez le chien une diminution de la fibrine, tandis que le rapport *sérine/globuline* tend vers I.

Dans l'immunisation il y aurait augmentation absolue et relative de la globuline. Ce serait le taux de la pseudoglobulins qui seul augmenterait (239a).

Les variations du quotient protéique, suivies au cours des infections chroniques ont également donné lieu à de nombreux travaux. On assiste dans la tuberculose à une augmentation de la globuline (BIRCHER et MAC FARLAND 43a-ACHARD 7-8-9a) avec, semble-t-il un rapport entre l'intensité de l'infection et cette augmentation. Pour BAER les variations de la globuline précéderaient parfois les variations cliniques. L'estimation du taux de la globuline a même pour certains auteurs une valeur pronostique. Il est bon à ce sujet de faire remarquer qu'il y a un rapport entre la vitesse de sédimentation et la teneur en globuline du sérum. La chute des globules rouges se fait plus rapidement dans une solution de sérumglobuline que dans une solution de sérumalbumine (FAHRAEUS 74). NEERGAARD par contre ne considère pas ce parallélisme comme aussi évident. ACHARD, BARIETY et CODOUNIS (8) signalent qu'en cas de méningite tuberculeuse primitve, il n'y a aucun trouble de l'équilibre protidique.

Dans la syphilis, on note également un accroissement du taux de la globuline (158) et ce serait la fraction euglobuline qui serait spécialement augmentée (ROWE 258-259 BIRCHER et MAC FARLAND 43a). Cette variation serait aux yeux de NOGUCHI (196) aussi importante que la réaction de Wassermann (292). Après quelques injections de novarsénobenzol, la globuline revient à son taux normal.

Dans le cancer les modifications n'apparaissent qu'assez tardivement. La globuline augmente (89) et son taux peut atteindre

jusqu'à 75% de la totalité des albumines. La sérine au contraire diminue. Dans les tissus constituants de la tumeur elle-même les globulines prédominent. L'augmentation de la sérumglobuline paraît être dûe aux déchets protidiques tumoraux (LOEPER 174-175-176-177-178) FILINSKY (76) pense au contraire à une augmentation indirecte par lésion secondaire du foie.

Dans les néphrites il y a également une augmentation du taux des globulines (14-70-69a-83-167-171-172) avec abaissement du rapport *sérine/globuline*. Pour certains auteurs en comparant sang et urines on ne note pas de rapport entre l'augmentation des globulines et l'importance de l'albuminurie, mais un certain parallélisme entre la valeur des globulines dans le sérum et dans l'urine (60).

D'autres états pathologiques: anémie pernicieuse (71), diabète sucré s'accompagnent également d'augmentation du taux de la globuline. Mais c'est certainement dans la néphrose lipoïdique que l'on a noté les bouleversements les plus importants du taux et de la répartition des protides. On rencontre en effet dans cette affection un abaissement considérable des protides totaux (11-12-13-188). EPSTEIN (69a) signale des chiffres de 39 gr. par litre, GOVAERTS (97), un chiffre de 35 gr., MERKLEN, Melle LEBRETON et CAHN (187a) un taux de 54,25 gr., et WAHL (303a) un taux de 29,7 0/00. La sérine est également très abaissée: 14 gr. 0/00 dans un cas que nous avons vu récemment. Le chiffre le plus bas est signalé par WAHL (304a) 2,81 0/00 deux jours avant la mort du malade. La globuline reste aux environs de la normale (EPSTEIN). Au contraire KOLLERT et STARLINGER signalent de fortes augmentations de cette dernière. Il semble qu'à un chiffre de sérine bas corresponde un taux élevé de globuline. Le fibrinogène est augmenté, parfois considérablement (KOLLERT et STARLINGER). Le rapport albumineux est toujours abaissé et le plus souvent inversé, mais non constamment. Les rémissions peuvent s'accompagner d'une élévation du taux de la sérine et du retour vers la normale du coefficient albumineux (ACHARD, BARIETY et CODOUNIS 10).

Par ce bref aperçu des données recueillies sur les variations du rapport *sérine, globuline* au cours des différents états pathologiques on voit qu'il est bien difficile de tirer des indications diagnostiques d'un quotient qui varie toujours dans le même sens au cours d'affections aigües ou chroniques, d'origines les plus variables. Cette constatation doit-elle nous faire abandonner toute investigation dans ce domaine, ou ne doit-on pas au contraire mettre en cause la valeur et le sens des techniques utilisées, pour expliquer l'impossibilité d'une systématisation fructueuse des résultats obtenus? C'est ce que nous avons tenté de démontrer au cours des recherches que nous exposerons dans la deuxième partie de ce travail.

SÉPARATION ET DOSAGE DES DIFFÉRENTS PROTIDES.

1°) *Séparation.*

Pour obtenir les différentes protéines à l'état pur on se fonde sur les caractères de précipitation spécifiques de chacune des protéines.

Le fibrinogène coagule soit spontanément, soit dans le plasma citraté par addition de chlorure de sodium et de chlorure de calcium (méthodes de GRAM, de HOWE, de WU). On obtient ainsi un coagulum qui représente la totalité de la fibrine et que l'on peut essorer, laver et sécher.

Le fibrinogène éliminé, il reste dans le sérum : la globuline, la sérumalbumine et la myxoprotéine de PIETTRE.

Les procédés employés pour séparer la globuline des autres protides du sérum sont soit physiques soit physico-chimiques, soit chimiques. Parmi les procédés physiques on doit d'abord citer la dialyse (17-115-148). Ce procédé pour amener une séparation complète doit être poursuivi très longtemps. Aussi n'est-on pas toujours à l'abri d'une altération du sérum ou du liquide dialysé. L'électrodialyse employée postérieurement à la dialyse est une méthode qui joint aux avantages de cette dernière, celui de la rapidité (252-72-277).

Plus facile à manier est le procédé de séparation par les acides. HARDY (122) a montré que la globuline en solution est précipitée par les acides après dilution. Les acides employés sont l'acide acétique dilué, l'acide chlorhydrique dilué. QUINAN (233a) emploie le gaz carbonique, qu'il fait agir sur du sérum dilué 10 fois. Pour HAMMARSTEN cette dernière méthode donnerait des résultats différents suivant les animaux considérés : son application serait meilleure dans le cas du sérum de bœuf que dans celui de sérum de cheval. Nous reviendrons longuement sur ce

procédé dans la partie originale de ce travail. L'alcool et l'acétone à basse température donnent également un précipité de protéines totales (233-226). Mais la méthode d'application la plus générale est celle qui fait intervenir le pouvoir qu'ont les solutions salines de précipiter, suivant leur concentration, les différents protides. Le désavantage de cette technique est évidemment la purification nécessaire du produit obtenu, pour éliminer l'excès d'électrolytes. La précipitation des différents protides est obtenue dans ce procédé par l'action de solutions salines à des concentrations de plus en plus fortes, la sérine étant précipitée la dernière. En diluant le précipité, on amène une redissolution du produit obtenu. Le mécanisme de cette précipitation est expliqué différemment suivant les auteurs. Pour HOFMEISTER (135) les sels retirent aux protéines leurs possibilités de se dissoudre. PAULI (210) qui admet que la solubilité des globulines est dûe à l'action des ions libres et des ions salins électro-positifs ou électro-négatifs, pense qu'une augmentation des molécules salines électriquement neutres, favorise la séparation de la globuline, sans qu'il soit nécessaire de faire intervenir d'autres phénomènes : la modification de la dissociation entraîne une modification parallèle de la solubilité. Pour MELLANBY (186a) le précipité est dû à l'apparition d'un produit d'union moléculaire indissoluble entre le sel et la protéine. Dans ces derniers temps HAFNER et KURTHY (112a) ont émis l'hypothèse suivante : en présence d'une grande quantité d'électrolytes dans la solution aqueuse d'un non électrolyte, et par suite de la grande activité du champ électrique ainsi créé, le non électrolyte se dirige vers la partie du champ la moins forte et il se produit à cet endroit une accumulation et la formation de deux phases. On fait donc intervenir dans cette hypothèse deux facteurs :

1°) La polarisation des protéines par rapport au liquide dissolvant.

2°) L'activité des ions salins, différente pour les différents sels.

HAFNER (109) pense également que puisque la polarisation électrique est dûe à la composition chimique, ce procédé devrait permettre, dans certaines conditions expérimentales bien déterminées, d'isoler certaines individualités chimiques.

Pour obtenir la précipitation des protides, plusieurs sels ont été employés. LEWITH (170) a étudié pour différents sels la concentration à laquelle apparaît le précipité de globuline et celle pour laquelle il est complet (dans la mesure où la solubilité des sels envisagés le permettait). La globuline précipite la première et quand sa précipitation est complète la sérine précipite également. Quantitativement l'action des différents sels est inégale. Seuls le sulfate d'ammonium, l'acétate de potassium et le sulfate de magnésium permettent une précipittaion complète de la globuline; les sulfates seuls ont été retenus pour le dosage.

HOFMEISTER (135) a montré également que le pouvoir de précipitation ne dépend pas uniquement de la solubilité des sels mais aussi de la nature des différents anions. Voici la série de ces anoins par ordre décroissant de pouvoir précipitant: *sulfate . . phosphate . . acétate . . citrate . . tartrate . . bicarbonate . . chromate . . chlorure . . nitrate . . chlorate . .*

Les cations liés aux anions ont aussi une importance. Voici, par ordre de pouvoir précipitant décroissant la série obtenue par HOFMEISTER: *Lithium . . . sodium . . . potassium . . . ammonium . . . magnesium.*

Nous allons maintenant examiner la précipitation par les sels les plus communément employés: le sulfate de magnésium, le sulfate d'ammonium et le sulfate de sodium.

I°) Le *sulfate de magnésium* fut le premier employé. DENIS (62) le signale en 1859, pour la séparation des albumines et des globulines (48). La globuline est précipitée par la saturation du sérum avec du sulfate de magnésium pulvérisé. Pour STARLINGER et HARTL (289) une solution saturée a le même effet. HAMMARSTEN croit que ce sel est incapable de précipiter la paraglobuline. Cependant PORGES et SPIRO (232) signalent que l'euglobuline précipite pour 40 à 50 volumes et la pseudoglobuline pour 70 à 80 volumes d'une solution saturée.

II°) *Le sulfate d'ammonium* sépare les corps protéiques du sérum en deux groupes, le plus facilement précipitable étant

identifié à la globuline et le plus difficilement précipitable à la sérine. Le mélange à parties égales d'une solution saturée à froid de SO4 (NH4) 2 (c'est-à-dire 52,4 gr. de sel pour 100 parties d'eau) et d'une solution de ces protéines donne un précipité de globuline. Des concentrations plus faibles de sulfate d'ammonium permettraient une séparation en plusieurs fractions de la globuline. Entre 30 et 37 volumes pour cent d'une solution saturée de SO4 (NH4)2 on a, d'après PORGES et SPIRO, l'euglobuline; entre 37% et 44% on a la pseudoglobuline I; et entre 44% et 50% la pseudoglobuline II.

III) PINKUS (222) a montré que le pouvoir de précipitation incomplet du *Sulfate de sodium* ne dépendait que de sa faible solubilité dans l'eau et qu'à 30° ce corps avait le même pouvoir de précipitation que le sulfate d'ammonium. En employant le sel anhydre à 30° la globuline est précipitée à 1/2 saturation (solution à 25%) et l'albumine l'est avec une solution à 50%. Ce sel présente de gros avantages: il ne trouble ni les réactions colorées; ni le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. Par refroidissement, ce qui amène une précipitation du sulfate de sodium, la teneur en sel de la solution peut être abaissée à 5% par cristallisation de ce sel. HASLAM (128), HOWE (140-144-145) ont employé cette méthode et ont trouvé que les résultats étaient comparables à ceux obtenus à l'aide du sulfate de magnésium et du sulfate d'ammonium (20). PORGES et SPIRO ont précipité à 30° l'euglobuline, les pseudoglobuline I et II au moyen de solutions de plus en plus concentrées de sulfate de sodium.

Par contre STARLINGER et HARTL ont obtenu à l'aide du sulfate de sodium des quantités de globulines moindres qu'avec le sulfate d'ammonium (289-291).

Il est bon de faire remarquer que les différents procédés que nous venons d'envisager donnent des résultats qualitativement et quantitativement différents, ce qui peut dans une certaine mesure expliquer les divergences existantes entre les différents auteurs au sujet de la composition fondamentale des protides sanguins.

2° *Méthodes de dosage.*

Nous n'envisagerons pas évidemment ici toutes les méthodes employées pour le dosage des protéines du sérum, nous décrirons succintement les plus caractéristiques d'entre elles et les principes généraux dont elles relèvent. D'une façon générale les procédés de dosage reposent sur la séparation des protides par les solutions salines à différentes concentrations. On pèse les précipités ainsi obtenus ou bien on fait porter la mesure sur la solution receuillie après filtration (méthodes réfactométriques, colorimétrique ou procédé de HOWE).

Si l'on a à faire à du plasma on peut doser le fibrinogène par la méthode de GRAM (103).

Pour ce faire on mélange 2cc. de plasma citraté, 9cc. de chlorure de sodium à 0,9% et 2cc. d'une solution de chlorure de calcium à 1%, on porte à l'étuve à 37° pendant une heure et demie. On obtient ainsi une coagulation qui doit être complète. Le caillot se détache facilement, on le place sur du papier filtre qui absorbe l'eau. On détache ensuite sous l'eau la pellicule de fibrine restante, on sèche, on dégraisse par l'alcool et par l'éther. On pèse après dessication à l'étuve.

C'est surtout pour le dosage de la globuline et de la sérine que les méthodes sont nombreuses (39-44-63-85-95-104-136). Nous envisagerons successivement les procédés gravimétriques, réfractométriques, réfracto-visosmétriques, colorimétrique, et par dosage de l'azote des protides.

I) *Méthodes gravimétriques.* — D'une façon générale on précipite la globuline et l'albumine totale, par différence on obtient la sérine. Ou bien on dose la globuline et la sérine, la somme des deux donne l'albumine totale.

a) Méthode décrite par STARLINGER et HARTL (289):

On part de 0,5 cc. de sérum auquel on ajoute quelques centimètres cubes d'acide acétique à N/50 et quelques gouttes d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. On coagule au bain-ma-

rie bouillant, on filtre sur filtre taré. On lave le précipité à l'eau puis à l'éther-alcool, on sèche et on pèse. On obtient ainsi le poids de l'albumine totale. Pour avoir la sérine, à 0,5 cc. de sérum on ajoute 1 cc d'eau et 1,5 cc d'une solution saturée de sulfate d'ammonium; on centrifuge 30 minutes après avoir laissé au repos plusieurs heures. On prélève 2 cc. du liquide surnageant auquel on ajoute une même quantité d'acide acétique N/25 et on porte au bain-marie bouillant. On filtre sur filtre taré, on lave à l'eau jusqu'à disparition des dernières taces de sulfate d'ammonium, puis à l'alcool-éther. On sèche et on pèse. Par différence on obtient la sérine.

b) De cette méthode se rapproche celle qu'a employée Melle Laurent dans le laboratoire du Professeur Abrami.

On précipite la globuline par addition à 5 cc. de sérum de 5 cc. d'une solution saturée de sulfate d'ammonium ramenée à un pH constant, proche du point isoélectrique des globulines. Après centrifugation on décante le liquide surnageant. Le précipité est redissous dans une petite quantité d'eau et la solution est additionnée d'un même volume de la solution de sulfate d'ammonium. Après une nouvelle centrifugation on réunit le liquide surnageant à celui précédemment obtenu. Le précipité de globuline est à nouveau redissous et à la solution obtenue on ajoute 4 volumes d'alcool à 95°. On porte au bain-marie bouillant pendant 20 minutes. Le liquide obtenu dans les deux premières décantations est traité de la même façon. La coagulation par l'alcool à chaud effectuée, on filtre sur filtre taré, on lave juqu'à disparition des dernières traces de sulfate d'ammonium à l'eau distillée, puis à l'alcool et à l'éther. On sèche et on pèse. L'albumine totale est obtenue ici par addition des deux résultats.

c) Méthode de Kayser (159).

Cette méthode donne directement l'albumine totale par précipitation de 5 cc. de sérum par un mélange à parties égales d'alcool et d'acétone (50 cc. pour 5 cc. de sérum). On filtre le précipité sur filtre taré, on sèche et on pèse. La globuline est précipitée sur une deuxième prise par du sulfate de magnésium à saturation, on filtre et on prend une partie aliquote du filtrat. Dans cette portion la sérine est précipitée par l'acide acétique après addition d'un peu de formol neutre. On fait bouillir, on filtre sur filtre taré et on lave avec de l'eau chaude additionnée d'acide acé-

tique. On passe à l'éther et à l'alcool, on sèche et on pèse. Connaissant le volume total primitif (sérum plus solution de sulfate de magnésium) et le volume du prélèvement, on déduit du poids obtenu par pesée la teneur en sérine du sérum en expérience. On a la globuline par différence entre l'albumine totale et la sérine.

d) Méthode de BIERRY (42).

On ne cherche à obtenir que les albumines totales. C'est le pouvoir précipitant de l'acétone qui a été employé. On obtient des albumines blanches, très pures, permettant de faire des analyses.

3 gr. de plasma sont mélangés à 10 cc. d'acétone pure du bisulfite. On laisse reposer 3 heures. On centrifuge, puis on décante sur un filtre taré, afin de recueillir les quelques flocons qui pourraient surnager. On délaye le culot avec 5 cc. d'acétone, on centrifuge à nouveau, on décante sur le filtre. On répète ceci 2 à 3 fois. Au culot finalement obtenu on ajoute 20 cc. d'une solution de chlorure de sodium à 0,5%, une goutte de rouge de méthyle à 0,4% et, goutte à goutte, de l'acide acétique à N/10, afin d'obtenir un pH de 5,5. Les tubes sont alors portés au bain-marie bouillant pendant 2 heures pour coaguler l'albumine. On centrifuge et on décante toujours sur le filtre taré (on s'assure par le réactif de TANRET que le liquide filtré ne contient plus d'albumine). On lave alors le précipité par 10 cc. d'eau bouillante, on centrifuge et on décante à nouveau. On répète les lavages jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipité par le nitrate d'argent. On lave une à deux fois par l'alcool absolu, puis trois à quatre fois à l'éther. On sèche à 105° et on pèse le tube et le filtre.

e) On peut également obtenir le poids des albumines totales par pesée après séchage de ces albumines préalablement traitées dans un appareil de Kumagava. On a dans ce cas des protides purs et complètement délipoïdés. GRIGAUT (105).

f) Méthode à l'acétone de PIETTRE (19-224-225-226-227-303-304).

On part de 20 cc. de sérum contenu dans un becher placé dans la glace. On fait tomber lentement 50 cc. d'acétone. La

précipitation des protéines se fait ainsi en petits flocons; ce qui facilite l'extraction des lipides qui se dissolvent dans l'acétone. On égoutte et on essore soigneusement sur un buchner. On lave alors à 2 reprises par 20 à 25 cc. d'acétone froide, puis 3 à 4 fois avec de l'éther qui enlève les éthers de la cholestérine. On a finalement des protéines complètement sèches que l'on peut délipider encore plus complètement en les broyant dans l'éther à 5 ou 6 reprises. En procédant rapidement avec l'acétone on évite l'action coagulante de ce liquide. Les protéines séchées sont redissoutes facilement dans l'eau en évitant les pertes (un volume d'eau égal à celui du sérum initial suffit en général). La dissolution obtenue, on fait des essais de précipitation de la globuline par l'acide chlorhydrique N/100 sur de petites quantités de solution jusqu'à floculation maximum. On a ainsi par rapport au volume d'essai, la quantité d'acide chlorhydrique N/100 à ajouter pour obtenir la précipitation totale des globulines. Par centrifugation on isole le précipité de globulines qu'on lave 2 à 3 fois et on réunit l'eau de lavage au liquide surnageant. On pèse le précipité de globulines après séchage.

Le liquide restant après la séparation des globulines est additionné d'un égal volume d'acétone froide. Il se forme un précipité que l'on centrifuge. Le culot est repris par un égal volume d'eau. La sérine se redissout et il reste en suspension de gros flocons grisâtres qui se rassemblent en une masse visqueuse, c'est la myxoprotéine. S'il reste un peu de globuline dans le liquide, le précipité est blanchâtre et grenu. Le liquide clair est décanté et traité à nouveau par l'acétone, le précipité est redissous à nouveau dans l'eau. On renouvelle cette opération jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité de myxoprotéine. On rassemble la myxotrotéine obtenue, l'on sèche et l'on pèse.

La solution de sérumalbumine est débarrassée de l'acétone et séchée sur vide sulfurique.

II) *Dosage réfractométrique.* — D'après ROBERTSON (242-243-244) l'indice de réfraction spécifique des composants du sérum dépend de la concentration, la réfraction totale est la somme des réfractions partielles et pour les différents constituants du sérum la réfraction spécifique est unique et constante.

La microméthode décrite par ROBERTSON est différente de celle de REISS (236-238) par le fait qu'on évalue le taux de l'albumine totale, de la globuline, de la sérine et des corps non protéiniques. La méthode demande 1,5 cc. de sérum. On opère

dans des tubes que l'on peut fermer à la lampe. ROBERTSON s'est servi du réfractomètre de PULFRICH en opérant à la lumière jaune du sodium.

On fait une première détermination des corps non protéiniques. Pour cela on mélange 1 cc. de sérum et 1 cc. d'acide acétique N/25, le tube fermé est agité et porté au bain-marie pendant 2 minutes environ. Après refroidissement on brise le tube, on sépare par centrifugation le coagulum et le liquide dont on prend l'indice de réfraction : soit R, ainsi que celui d'une solution d'acide acétique N/50 : soit r. La différence R-r multipliée par 2 donne l'indice réfractométrique des corps non protéiniques : (R-r.) 2 = D. En divisant l'indice de réfraction ainsi trouvé par 0,0016 on a le taux des corps non proténiques.

Détermination de la sérine. On met en présence 0,5 cc. d'une solution saturée de sulfate d'ammonium et 0,5 cc. de sérum, on agite et on centrifuge. Le liquide est transvasé et additionné de 0,25 cc. d'eau distillée. Après mélange on prend l'indice réfractométrique R1 du mélange et celui r1 d'une solution de sulfate d'ammonium au 1/4 saturée. La différence R1-r1 est égale au 1/4 de l'indice de réfraction de la sérine et des corps non protéiniques. Donc (R1-r1) 4—D = D1, D1 étant d'indice de réfraction cherché de la sérine. En divisant ce chiffre D1 par 0,00177 on obtient le taux de la sérine.

Pour la globuline on prend l'indice réfractométrique du sérum R2 et celui de l'eau distillée r2. De la différence R2-r2 on retranche l'indice réfractométrique des non protéiques et, du résultat on soustrait l'indice trouvé pour la sérine. On a ainsi l'indice réfractométrique de la globuline : (R2-r2)—(D + D1) = D2 ce chiffre divisé par 0,00299 donne le taux de la globuline dans le sérum. Donc en résumé :

$$\frac{(R\text{-}r)\,2}{0{,}0016} = \frac{D}{0{,}0016} = \text{Taux des corps non protéiniques}$$

$$\frac{(R1\text{-}r1)4 - D}{0{,}00177} = \frac{D1}{0{,}00177} = \text{Taux de la sérine.}$$

$$\frac{(R2\text{-}r2) - (D+D1)}{0{,}00229} = \frac{D2}{0{,}00229} = \text{Taux de la globuline.}$$

Le taux des albumines totales est obtenu par addition des taux de globuline et de sérine.

Il y aurait dans cette méthode différentes causes d'erreur (12a). Pour BERGER et PETSCHACHER tous les corps coagulés par la chaleur sont considérés comme des albumines, ce qui est discutable.

III) *Méthode réfracto-viscosimétrique.* — On évite avec ce procédé de troubler l'état colloïdal du sérum. Il repose sur l'hypothèse que l'indice réfractométrique des corps non protéiniques du sérum est en général constant (sauf dans l'urémie, l'hyperglycémie et la lipémie) et que la réfraction dûe aux protéines dépend de leur concentration et non du rapport *sérine/globuline*. D'autre part ROHRER (245) pense que les variations des corps non protéiniques n'ont pas d'influence sur la viscosité des corps protéiques. Cet auteur a montré les relations qui existaient entre viscosité, réfraction et teneur en globuline : connaissant deux de ces variables, on peut déterminer la troisième. D'après des essais comparatifs, cette méthode semble donner des chiffres un peu élevés (82) ; mais elle paraît cependant applicable aux recherches en série.

IV) *Méthode colorimétrique de* WU. (313-314). — Elle est basée sur la teneur en tyrosine des diverses protéines du plasma et sur l'évaluation colorimétrique de cette tyrosine.

Dosage de la fibrine. — A 1 cc. de plasma on ajoute 28 cc. de chlorure de sodium à 0,8% et 1 cc. de chlorure de calcium à 2,5%, on agite et attend 20 minutes. On fait adhérer le caillot de fibrine à un petit agitateur, on essore ce coagulum et on filtre le liquide restant qui servira à déterminer la globuline et la sérine. On met l'ensemble de la fibrine dans un tube à centrifuger de 15 cc. avec 4 cc. de carbonate de soude à 1% ; on porte au bain-marie bouillant en agitant jusqu'à désintégration du caillot de fibrine. On ajoute alors 10 cc. d'eau et l'on centrifuge après avoir mélangé. Le liquide surnageant est mis dans une fiole de 25 cc. avec 1 cc. d'acide sulfurique à 5%. Dans une autre fiole de même capacité on met 1 cc. de solution standard de tyrosine à 0,2 0/00 et on y ajoute 15 cc. d'eau. Dans chaque fiole on ajoute 0,5 cc. du réactif de WU pour le dosage des phénols et 3 cc. de carbonate de soude à 20%, on agite et l'on met une

goutte d'éther pour faire tomber la mousse, on complète à 25 cc. et après 5 minutes on fait la lecture colorimétrique. On sait que 1 mmgr. de tyrosine correspond à 16,4 mmgr. de fibrine. Donc si l'on place le standard à 20 mm et que l'équivalence de teinte se fasse au moment où la solution à déterminer est à une hauteur F la quantité de fibrine par cc. du plasma en expérience est donnée par la formule :

$$\frac{20}{F} \times 0{,}2 \times 16{,}4$$

Dosage de la sérine. — A 1 cc. de plasma on ajoute 9 cc. d'une solution de sulfate d'ammonium saturée aux 5/9, on mélange et on attend 30 minutes. On filtre et 1 cc. de filtrat est mis dans un tube de centrifugeuse de 15 cc. avec 12 cc. d'eau et 1 cc. de tungstate de soude à 10%. On mélange et on ajoute 1 cc. de S04H2 2/3N, on agite et on centrifuge. On décante et si le précipité humide obtenu est inférieur à 0,5 cc. on refait les opérations précédentes à partir d'un autre centimètre cube de filtrat. On dissout le précipité dans 1 cc. de tungstate de soude et l'on ajoute 13 cc. d'eau et 1 cc. d'acide sulfurique à 5%. On centrifuge et on décante. Le précipité est alors additionné de 10 cc. d'eau et de 1 à 2 gouttes de carbonate de soude à 20%. On fait passer la solution ainsi obtenue dans une fiole jaugée de 25 cc. On ajoute alors 0,5 cc. de réactif des phénols et 3 cc. de carbonate de soude comme pour la fibrine et l'on prépare le standard comme ci-dessus. On fait la comparaison colorimétrique.

Dosage de la sérine et de la globuline. — Le filtrat recueilli après précipitation de la fibrine sert à cette détermination. On en prend 2 cc. dans un tube de 15 cc. et on procède comme pour le dosage de la sérine.

Calcul. — La solution employée pour déterminer la sérine est à 1/10 et on en utilise 1 cc., celle employée pour la sérine plus la globuline est à 1/30 et on en utilise 2 cc. Le standard étant à la division 20 mm. de l'échelle du colorimètre, supposons que la lecture soit pour la sérine A mm. et que pour sérine + globuline, elle soit T mm.

La tyrosine totale pour la sérine + la globuline dans 1 cc. de plasma sera en mmgr. :

$$\frac{30}{2} \times \frac{20}{T} \times 0{,}2 = \frac{60}{T}$$

La tyrosine totale sera de même pour la sérine :

$$10 \times \frac{20}{A} \times 0{,}2 = \frac{40}{T}$$

La tyrosine de la globuline est donc pour 1 cc. de plasma.

$$\frac{60}{T} - \frac{40}{A}$$

Or, un mmgr. de tyrosine correspond à 25,2 mmgr. de globuline et à 27,5 de sérine.

Les valeurs normales seraient les suivantes selon Wu :

Fibrine	0,2%
Sérine	4,9%
Globuline	2,0%

V. *Méthodes par dosage de l'azote.* — Dans ces méthodes on effectue des précipitations fractionnées des protides au moyen de solutions salines et on dose l'azote par la méthode de Kjeldahl, soit sur le précipité soit sur le filtrat. On calcule ensuite le taux des protides à l'aide de coefficients déterminés une fois pour toutes. Ceci suppose que le rapport *albumine/azote* est constant. Du point de vue purement technique, on doit si l'on se sert du sulfate d'ammonium comme agent précipitant, éliminer toute trace de ce sel avant le dosage final (187). Cullen et Van Slyke (58), qui ont employé ce sel, éliminent l'azote ammonical par distillation. Plus simplement on se sert de sulfate de magnésium, ou comme Howe, de sulfate de sodium en opérant les précipitations à 37°. Dans cette dernière méthode on opère le dosage de l'azote sur les filtrats.

Méthode de Howe (140-143-144-145). — Le *fibrinogène* est précipité sur 0,5 cc. de plasma par 14 cc. de chlorure de sodium à 0,8% et 1 cc. de chlorure de calcium à 2,5%. On filtre et on effectue un Kjeldahl sur 5 cc. de filtrat.— Soit N le chiffre d'azote trouvé.

L'euglobuline est précipitée à partir de 0,5 cc. de plasma par 15 cc. de sulfate d'ammonium à 14% après un séjour de 3 heures à l'étuve à 37°. Soit N1 le chiffre d'azote obtenu pour 1 cc. de filtrat.

L'euglobuline et la pseudoglobuline I sont précipitées à partir de 0,5 cc. de plasma par une solution à 18% après mise à l'étuve pendant 3 heures. Soit N2 le résultat du dosage pour 1 cc. de filtrat.

La *globuline* totale est précipitée toujours sur 0,5 cc. de plasma et après séjour à l'étuve par une solution à 22,2% — soit N3 l'azote dans 1 cc. de filtrat.

On obtient l'azote non protéinique n en faisant un dosage sur le filtrat après précipitation de 0,5 cc. de plasma par 15 cc. d'acide trichloracétique à 5%.

On dose également l'azote total du plasma: soit NT .

Les résultats sont les suivants:

Azote de fibrine =	NT — N
d'euglobuline =	N — N1
de la pseudogl. I =	N1 — N2
de la pseudogl. II =	N2 — N3
de la globuline totale	N — N3
de la sérine =	N3 — n

Cette méthode se rapproche de celle décrite par HOPKINS et PINKUS en 1901. Ces deux auteurs se servaient également du sulfate de soude comme agent de précipitation. Ils diluaient le sérum 2 à 4 fois, faisaient un azote total, puis précipitaient le fibrinogène, l'euglobuline et la pseudoglobuline et dosaient l'azote sur les filtrats. Par différence avec l'azote total on obtenait l'azote du constituant cherché.

RECHERCHES PERSONNELLES

RECHERCHES PERSONNELLES.

De ce que nous avons exposé antérieurement il ressort nettement que la question de beaucoup la plus importante et la plus fructueuse à étudier est celle de la liaison lipides-protides.

Du point de vue de la physiologie générale, nul doute que si nous arrivions à comprendre quelles conditions physicochimiques président à la formation du gliode dans le plasma sanguin, nous ne puissions transposer ces connaissances nouvelles au cas du protoplasme. Le problème des liaisons lipides-protides se pose, ici comme là, d'une façon identique. Abstraction faite de quelques formations différenciées, le protoplasme des êtres monocellulaires se révèle à l'ultramicroscope comme une gelée irrésoluble en grains, alors qu'il contient pourtant d'importantes quantités de lipides. Certains sérums, comme celui de l'anguille, par exemple, bien étudié par les physiologistes, contiennent jusqu'à 25 grammes de lipides par litre et 5 à 6 grammes de cholestérine (MAYER et SCHAEFFER 1912), sans présenter pour cela la moindre opalescence, ni même de granulations visibles avec l'appareil de ZSYGMONDY. Dans ces sérums, des corps aussi insolubles dans l'eau que les glycérides, les phosphoaminolipides, les stérols et leurs éthers sont invisibles en tant que phase distincte, étant engagés dans des combinaisons parfaitement hydrophiles. Nous ignorons tout du mécanisme intime de la formation de ces complexes, dont la connaissance nous est pourtant indispensable pour comprendre la constitution physico-chimique de la matière vivante.

Si nous considérons, maintenant, le problème des combinaisons lipido-protidiques du point de vue plus restreint de la biochimie normale du sang, nous voyons qu'en le résolvant nous pourrions établir enfin des techniques rationnelles pour la sépara-

tion des différents protides sériques. Actuellement il est impossible comme on l'a vu de décider du nombre de ces protides et de leurs taux respectifs dans le sérum. Il est facile de comprendre pourquoi : les méthodes mises en œuvre ont été en effet créées pour fractionner des globulines et des albumines *libres*, telles qu'elles existent dans les milieux comme le blanc d'œuf, les mélanges de protides végétaux extraits par la méthode d'Osborne, le lait etc.. Avons-nous le droit d'en étendre sans examen l'application à des milieux comme le plasma sanguin où non seulement les lipides sont combinés aux protides suivant un mode de liaison dont nous ignorons la nature, mais encore où ces différents protides, de points isoélectriques fort différents, sont associés entre eux à leur tour pour former d'énormes édifices moléculaires. Vlès dans un article déjà ancien a exprimé l'idée que dans le plasma ou le sérum, les différents protides isolés par les biochimistes et considérés par eux comme des entités chimiques, n'existent probablement pas à côté les uns des autres, à l'état indépendant. Ils forment des associations, des édifices moléculaires complexes. Ces différents ampholytes sont liés et les charges positives des uns neutralisant les charges négatives des autres, les complexes n'auraient pour Vlès qu'un domaine d'existence et de stabilité restreint dans l'échelle des pH, puisque dès que l'on dépasse, en agissant sur la réaction du sérum, le point isoélectrique d'un des constituants du complexe il se détache. C'est ce qui se passe lorsque par l'emploi de sels ou d'acides on précipite soit la sérine, soit la globuline qui n'auraient pas d'existence propre dans le plasma in vivo.

Fischer a d'ailleurs mis hors de doute l'existence de ces complexes. En se plaçant dans des conditions spéciales, il a pu, par cataphorèse du sérum, obtenir le transport à l'anode d'un complexe globuline + sérine qui ne se disloque que secondairement chacun des constituants se transportant alors isolément à l'un des pôles. Nous voyons ainsi le danger qu'il y a à utiliser des propriétés physico-chimiques aussi banales que les caractères de précipitabilité, pour distinguer comme espèces chimiques les 5 ou 6 protides dont l'existence est postulée dans le plasma.

Chercher à les identifier, dès maintenant, par la proportion des différents aminoacides qui entrent dans leur constitution, est peut-être un travail prématuré pouvant conduire aux résultats les plus contradictoires, tant que nous n'aurons pas la certitude d'en avoir réalisé la séparation intégrale.

Les remarques que nous venons de faire s'appliquent aussi bien à la chimie pathologique du sang, qu'à sa biochimie normale. Les conclusions tirées de faits étudiés dans le domaine de la première, n'auront de valeur qu'autant que les bases fournies par la seconde seront mieux établies. Comme nous l'avons vu les travaux de MACHEBOEUF ont bien établi l'existence d'un complexe sérique lipides-sérine. La seule critique que l'on puisse faire à MACHEBOEUF c'est qu'il ne semble prendre en considération qu'une possibilité : la formation de complexes entre la sérine et les lipides. S'il n'a pas rencontré de complexes où entrent les globulines, n'est-ce pas simplement que sa technique lui interdit de les apercevoir? S'il n'éliminait pas dans un premier temps ce qui, pour lui, représente la totalité des globulines du sérum, peut-être retrouverait-il ces protides engagés à leur tour, comme la sérine, dans des combinaisons analogues à celles étudiées par CHICK et par GARDNER et GAINSBOROUGH. L'existence de complexes globulines-stérols ou globulines-lécithine n'est pas en somme controuvée par les recherches de MACHEBOEUF. La réalité de leur existence, leurs variations qualitatives et quantitatives, à l'état normal et pathologique, représentent une partie du travail encore offert aux chercheurs, et que nous nous sommes efforcé d'étudier.

L'importance que nous attribuons aux complexes lipidoprotidiques du sérum nous conduit donc, on le voit, à prendre une attitude critique vis-à-vis des résultats acquis durant ces dernières années, dans les études faites sur les protides du sang. Les méthodes valables pour le fractionnement d'un mélange de protides libres ne conviennent peut-être pas pour la séparation de ces mêmes protides s'ils sont à l'état de complexes avec les lipides. La plupart des auteurs qui ont séparé globuline, sérine, myxoprotéine dans le sérum, ne se sont souciés des lipides présents dans

le milieu que pour les éliminer, une fois les fractionnements effectués au moyen de solutions concentrées d'électrolytes à saturation ou à demi saturation. Ils ont traité les précipités obtenus en fin de séparation, par les solvants organiques, dans le seul but d'éliminer les corps gras ne jouant plus alors que le rôle d'impuretés. Ce que nous avons dit plus haut montre assez que ce point de vue n'est pas le nôtre, puisque nous admettons que les lipides du sérum exercent leur influence sur les divers temps de la séparation des protides. Pour qu'une technique de fractionnement des protides du sérum soit valable, il faut, selon nous, qu'elle donne les mêmes résultats quantitatifs que les protides soient libres ou qu'ils soient engagés à l'état de complexes lipidoprotidiques dans le sérum sur lequel porte l'analyse. A notre connaissance cette preuve n'a jamais été fournie par les expérimentateurs et dans les cas pathologiques, les variations du rapport sérine/globuline obtenues, pourraient bien ne représenter que le retentissement, sur les méthodes de séparation employées, de modifications qualitatives et quantitatives des divers complexes lipidoprotidiques présents dans le milieu. Cette attitude d'esprit devait imprimer à nos recherches, comme on le verra, une direction toute spéciale.

PREMIÈRE PARTIE.

Pour réaliser les expériences que nous nous proposions de faire, il fallait donc, avant d'entreprendre toute séparation qualitative ou quantitative des protides sériques, rompre les complexes lipidoprotidiques existant dans le sérum et extraire dans la mesure du possible la plus grande partie des lipides présents, sans provoquer de dénaturation des substances protéiques à étudier.

A la vérité il ne se présentait à nous qu'une possibilité pour arriver à nos fins : l'emploi de la méthode de PIETTRE et VILA.

On sait que l'acétone, comme l'ont montré depuis longtemps de nombreux chercheurs est un précipitant énergique des protides, plus énergique même que l'alcool. Les cellules vivantes, levures par exemple, sont instantanément déshydratées quand on les traite par un excès d'acétone, leurs ferments endocellulaires sont fixés sans altération notable au sein du protoplasme coagulé. Cette action est d'autant plus rapide que l'acétone a un grand pouvoir de pénétration, étant miscible à l'eau en toutes proportions. Par ailleurs, ce corps présente la propriété d'être un solvant énergique des lipides : les glycérides, les stérols libres ou éthérifiés, les matières insaponifiables autres que les stérols se dissolvent parfaitement dans l'acétone même étendue ; l'acétone est un solvant de choix pour la cholestérine. Seuls les phosphoamino-lipides, tout au moins la plupart de ceux connus actuellement, sont précipités de leurs solutions par un excès d'acétone. Ils le sont d'autant plus quantitativement que le milieu contient des traces d'électrolytes (notamment ceux à cation bivalent : Ca, Mg). Mais la propriété la plus intéressante de l'acétone, utilisée fort ingénieusement par PIETTRE et VILA, réside dans le fait que pour des températures basses et des durées de contact courtes, l'acé-

tone précipite les protides sans les dénaturer. De cette notion de dénaturation, sur laquelle tant de travaux ont été publiés, nous ne retiendrons présentement que ce qui touche aux possibilités de remise en solution aqueuse. Une albumine est dite dénaturée lorsqu'ayant été traitée à chaud ou à froid par l'alcool ou d'autres solvants organiques, elle a perdu la possibilité de se redissoudre dans l'eau. L'acétone employée avec les précautions sus-indiquées par PIETTRE ne dénature pas les protides, comme cet auteur l'a souligné dès 1914.

Si nous traitons un sérum par un excès d'acétone, nous précipiterons donc la totalité des protides présents, et nous éliminerons en même temps un grand nombre de matières extractives, solubles dans l'acétone aqueux (glucose, acide lactique, urée, créatine etc..). Nous détruirons la plus grande partie des complexes lipidoprotidiques en faisant passer en solution les glycérides, le cholestérol et ses éthers, une partie des phosphatides et cela dans une proportion plus ou moins grande, suivant la température et le degré d'hydratation de l'acétone etc.. Enfin, et c'est un point sur lequel PIETTRE a également attiré l'attention, nous éliminerons la plus grande partie des électrolytes présents, soit à l'état libre dans le sérum, soit combinés aux protides, comme en témoigne la pauvreté en cendres des matières protéiques ainsi traitées. L'excès d'acétone employé étant éliminé par filtration sur vide ou par centrifugation, on constate par ailleurs que le précipité de protides totaux obtenu se redissout dans un volume d'eau distillée égal à celui du sérum initial avec une assez grande facilité, en donnant une solution légèrement opalescente. Ces faits vérifiés par nous d'une façon qualitative un grand nombre de fois, sur les sérums les plus divers, avant le passage à l'application quantitative, nous ont convaincu que la technique de PIETTRE réalise un procédé de choix pour atteindre le but que nous nous proposions : à savoir

I) destruction des complexes lipidoprotidiques,

II) délipidation des protides (plus ou moins poussée suivant le nombre de précipitations acétoniques) ;

III) élimination d'une grande partie des électrolytes et non électrolytes du sérum ;

autrement dit : libération des protides afin de les amener à un état de purification tel que les méthodes de séparation les plus simples puissent leur être appliquées.

En instituant leur procédé à l'acétone, PIETTRE et VILA avaient, semble-t-il, pour unique but de préparer de la sérine et de la globuline pures. Même dans son mémoire de 1920 PIETTRE n'a pas adapté sa technique à la détermination quantitative des protides du sérum.

Nous avons du déterminer par de multiples essais dans quelles conditions le procédé de PIETTRE (précipitation des protides totaux par l'acétone et séparation ultérieure des globulines par l'acide carbonique), pouvait être transformé en méthode quantitative, possédant tous les caractères d'une bonne méthode clinique : simplicité, rapidité, exactitude. Rien ne nous autorisait en effet à considérer à priori cette application comme facile. En particulier l'utilisation de l'acide carbonique proposée par QUINAN mais délaissée par presque tous les expérimentateurs parce que ne donnant pas de précipitation intégrale des globulines, demandait de multiples contrôles. Comme on le verra nous sommes arrivé à des résultats satisfaisants, tout en travaillant sur des quantités ne dépassant pas un centimètre cube de sérum par prise.

A) La première question posée était la suivante : *dans quelles conditions faut-il se placer pour évaluer par la précipitation acétonique les protides totaux du sérum ?* — L'expérience montre qu'en précipitant brutalement le sérum pur par un excès d'acétone, on obtient de mauvaises concordances pour les déterminations faites sur de mêmes quantités d'un même sérum (toutes les causes d'erreur purement matérielles étant évitées en se servant constamment de pipettes d'OSTWALD bien jaugées). Tout le bénéfice du procédé de PIETTRE se trouve perdu avec cette manière d'opérer, car la coagulation en gros flocons empêche l'élimination des lipides et des électrolytes. Ces résultats étaient d'ailleurs à prévoir. Mais, si on dilue au contraire le sérum avec une certaine quan-

tité d'eau avant la précipitation, les résultats changent. Nous avons adopté après différents essais la dilution du sérum par un volume d'eau, la précipitation se faisant par cinq volumes d'acétone, soit 10 cc. d'acétone pure et sèche. Le mode opératoire est alors le suivant :

dans un tube conique de centrifugeuse de 15 à 20 cc. taré au 1/2 mmgr. (après dessication dans l'étuve à 100°) on introduit 1 cc. de sérum d'eau bidistillée et 10 cc. d'acétone qui sont mélangés peu à peu au sérum dilué en agitant constamment.

On emploie de l'eau bidistillée exempte d'acide carbonique et de l'acétone pure du bisulfite, ou de l'acétone purifiée par le procédé ARNOULT et JUMEAU au permanganate alcalin (1). L'opération sera toujours conduite dans la mesure du possible sur des liquides refroidis par séjour dans l'eau glacée. En opérant dans ces conditions, on obtient des résultats fort satisfaisants, la précipitation se faisant en fins flocons l'élimination des électrolytes et des lipides est grandement facilitée. Dès que le sérum et l'acétone ont été intimement mélangés dans le tube de centrifugeuse on pratique instantanément la centrifugation durant quelques minutes dans un appareil tournant à 2500 tours. Le précipité adhère suffisamment au tube pour que l'acétone puisse être éliminée par simple décantation. On essuie soigneusement les parois du tube avec un agitateur recouvert de papier filtre et on porte le tube dans un premier temps à l'étuve à 40° (au-dessous de 56-58° point d'ébullition de l'acétone) pour permettre l'évaporation lente de l'acétone sans projections, puis à 100° pendant au moins 4 heures. On laisse refroidir dans un dessicateur et l'on pèse. On trouvera dans le tableau I les résultats obtenus par cette technique, comparés à ceux que fournissent les méthodes de GRIGAUT, de KAYSER et de LAURENT-ABRAMI.

L'examen de ce tableau I montre :

1°) que les résultats sont parfaitement réguliers ;

---

(1) Après la purification, on distille une première fois l'acétone en recueillant ce qui passe entre 56° et 58° ; on la distille une seconde fois pour la sécher en faisant passer les vapeurs sur du chlorure de calcium anhydre.

Tableau I

Comparaison des résultats obtenus en évaluant les *Protides totaux* par une précipitation acétonique, une précipitation alcoolique suivie d'extraction à chaud dans un Kumagava (GRIGAUT) ou l'emploi des méthodes de KAYSER et de LAURENT-ABRAMI.

Résultats en milligrammes par centimètre cube :

Espèces	I Précipitation acétonique	Grigaut	Kayser	Laurent Abrami	Poids sec dans le vide
Chien	76,5	76,9	74,9	70,40	97,6 98,2
Chien	67,5 66,5		61,02 59,5	58,1	
Porc	80 82	77,65	79,05	72,44	
Porc	90 91				
Bœuf	94,5 94	79	81	74,2	
Bœuf	90 91,5				
Mouton	82,5 83,5				
Mouton	77 76				
Poule	54,5 55,5			50,6	
Poule	56 56 56	55,2	53,3 52,9	49,76	
Cheval	110 109	94,2	93,9	88 87	
Lapin	77,75	73	77,1	73,7	95,2 96,6
Homme normal	81 79			70	
Homme normal	79,6 78			73,3	
Homme cardiaque	78,1 79				

2°) que la précipitation des protides totaux est intégrale; si on traite l'acétone décantée par le réactif de TANRET ou tout autre précipitant des protides on n'obtient pas trace de coagulum;

3°) la comparaison avec le taux de protides totaux obtenus par coagulation à l'alcool à froid puis extraction du précipité à l'alcool à 95° bouillant dans un appareil de KUMAGAVA, séchage et pesée, montre que la méthode à l'acétone (une seule précipitation acétonique) donne par rapport à cette méthode standard des résultats souvent concordants, parfois nettement plus forts;

4°) la comparaison avec les méthodes qui utilisent l'action des électrolytes comme le sulfate d'ammonium, montre que pour un certain nombre de sérums la technique à l'acétone donne des valeurs nettement plus élevées. La méthode de KAYSER utilisant comme précipitant un mélange à parties égales d'alcool et d'acétone donne au contraire des valeurs très proches de celles obtenues par la méthode que nous avons employée.

Les premiers résultats étaient donc fort encourageants. La détermination des cendres faites sur les précipités de protides totaux montrait qu'une partie importante des électrolytes et des non électrolytes du sérum avait été éliminée et le dosage des lipides révélait que si l'élimination de ces derniers était loin d'être totale, elle était cependant importante. Ces constatations nous permettaient en tous cas de comprendre pourquoi les résultats obtenus étaient fréquemment plus forts que ceux fournis par la méthode standard à l'alcool.

B) Avant de perfectionner la méthode il importait également de déterminer si par une seule précipitation acétonique suivie de redissolution des protides totaux dans l'eau bidistillée, un milieu favorable à la précipitation quantitative des globulines se trouvait réalisé. Nous avons alors étudié la *précipitation quantitative des globulines sériques après précipitation par l'acétone des protides totaux et redissolution du précipité dans l'eau bidistillée.*

Le précipité de protides totaux obtenu par précipitation acétonique suivant la technique ci-dessus est immédiatement redissous, après courte centrifugation (30 secondes à 2.500 tours) et décantation de l'acétone, dans une quantité d'eau égale à 10 cc. au plus (quantité que de nombreux essais nous ont montré être la plus favorable). On remet peu à peu le précipité en solution au début avec un fin agitateur, puis ensuite à l'aide d'une agitation énergique. On obtient ainsi une solution claire parfois légèrement opalescente, mais ne donnant aucune sédimentation soit par le repos soit par centrifugation. Dans cette solution on fait passer pendant 10 minutes à l'aide d'un tube capillaire un courant rapide de gaz carbonique pur. Une trace d'alcool octylique empêche totalement la formation de mousse. Dès les premières minutes, le contenu du tube se trouble, le liquide devenant franchement opalescent puis laiteux (précipitation en fins granules). On centrifuge alors à 2.500 tours pendant 3 à 4 minutes, on décante l'eau et l'on sèche à 100° jusqu'à poids constant; on pèse avec les précautions d'usage.

Les résultats figurent dans le tableau II. L'examen de ce tableau montre que les résultats sont fort homogènes, ils sont très concordants pour un même sérum. Par ailleurs la comparaison avec les méthodes de LAURENT et de KAYSER montre que les chiffres fournis par la méthode à l'acétone sont *du même ordre de grandeur* que ceux obtenus par ces deux procédés.

⁂

Comme on le voit, ces premières expériences d'orientation étaient parfaitement encourageantes en ce qui concerne les protides totaux, mais ce sont surtout les résultats se rapportant aux globulines qui montrent un fait nouveau: la précipitation des globulines par l'acide carbonique après élimination d'une partie des lipides et d'une partie des électrolytes, permet d'obtenir instantanément des chiffres de globulines du même ordre que ceux obtenus par d'autres méthodes, contrairement au procédé de QUINAN, lequel n'en précipitait qu'une très faible partie. Si l'on fait la comparaison des résultats obtenus en saturant d'acide car-

Tableau II.

Comparaison des globulines fournies par le CO_2 après une précipitation à l'acétone et redissolution et des globulines obtenues par les méthodes de KAYSER et de LAURENT-ABRAMI. (Tous les résultats sont exprimés en milligrammes par centimètre cube).

Espèce	1 Acétone + CO^2	Kayser	Laurent Abrami	Lipémie ‰
Poule	29,6 28,3	35,5	32,6	
Poule	28 29		33,6 32,4	13,8
Chien	29,6 30,3	26,9	29,8	16,4
Chien	20,9 21,5	20,41	28,6 29,04	
Bœuf	42,2 42,4	44,7	39,2	6,78
Bœuf	42 43,5	51,4		
Porc	47 48	31,5	29	8,1
Porc	27,5 27			
Porc	28,5 28,5			
Bœuf	33 32,5			
Cheval	45,7 44,4	59,4		5,2
Cheval	29,5 29,6			
Lapin	23,4	32,2	29,1	4,8
Anguille	25,4 26	29,5	29	
Mouton	39	37,6		
Homme normal	30,4 29		31	
Homme normal	32,9 32,4			
Homme normal	34,5 34		27,8	

Homme myocadite	33,5 34,5		35,1	
Homme hypertension	40,4 41,5		55,4	
Homme néphrose lipoïdique	23 23			

bonique du sérum délipidé ou non, on a, pour différentes espèces animales, des chiffres analogues à ceux figurant dans le tableau III. Le seul fait d'avoir traité le sérum une fois à l'acétone permet d'obtenir des taux de globulines 4 à 7 fois plus forts. (Tableau III).

Comment interpréter ce fait? PIETTRE a signalé que la précipitation acétonique avait une double action: élimination d'une grande partie des électrolytes et délipidation. A laquelle de ces deux actions devons-nous rapporter les résultats observés? Nous n'avons pour le savoir qu'à réaliser nos expériences dans des milieux contenant des quantités variables d'électrolytes après une précipitation à l'acétone. Après avoir précipité les protides totaux d'un sérum par l'acétone, on les remet en solution soit dans 10 cc. d'eau bidistillée, soit dans 10 cc. d'une solution de chlorure de sodium à 2,5 0/00 ou à 5 0/00. On précipite alors dans chacune de ces solutions les globulines par le gaz carbonique. On obtient dans le premier cas sur 3 échantillons:

32,6 —32,6 —32 (en milligrammes par centimètre cube). Dans le deuxième cas on a 29 — 28,5 — 29 et dans le troisième cas 25 — 24,5 — 24.

On voit donc que, si la présence d'électrolytes gêne, comme il fallait s'y attendre la précipitation des globulines, leur action est loin d'être comparable à celle des lipides pour les concentrations réalisées dans le sérum. Nos résultats nous montrant l'importance de l'action empêchante des lipides sur la précipitation des globulines, nous avons été conduit à examiner si la quantité de globuline précipitée par l'acide carbonique augmentait par une délipidation plus poussée: précipitations acétoniques répétées. Les protides totaux seront alors dégraissés au maximum, autant que le permet une méthode qui ne comporte pas d'extraction à chaud avec un solvant universel de tous les lipides, et la quantité de globulines précipitées sera vraisemblablement maximale.

Tableau III.

Comparaison des résultats obtenus en précipitant les globulines par l'acide carbonique sur un sérum dilué 10 fois (QUINAN) et sur le même sérum préalablement délipidé (même dilution). (Résultats en milligrammes par centimètre cube).

I ESPECE	II LIPEMIE ‰	III GLOBULINES SUR SERUM DILUE 10 fois	IV GLOBULINES SUR SERUM DELIPIDE puis dilué 10 fois	RAPPORT DES CHIFFRES DES COLONNES 3 et 4
Poule	16	19,5	29,6	2/3
Porc	8,1	6,8	48,3	1/7
Bœuf	6,78	11,3	42,4	1/4
Cheval	5,2	8,5	44,4	1/5
Chien	10	6,5	30,3	1/5
Homme		12,5	35,3	1/3

Résultats fournis par l'emploi de plusieurs précipitations acétoniques.

Quand nous avons voulu débarrasser plus complètement les protides sériques, des lipides qui les accompagnent, nous nous sommes heurté à un certain nombre de difficultés que nous résumerons brièvement.

Plus on purifie les protides par précipitations successives, éliminant sels et corps gras, plus leur précipitation ultérieure par adjonction d'alcool ou d'acétone devient difficile. Nous avions un instant songé, pour augmenter le pouvoir solvant du mélange précipitant vis-à-vis des phosphatides notamment, à utiliser un mélange à parties égales d'alcool et d'acétone, mais la redissolution des albumines ainsi précipitées, devenait très difficile. D'autre part le lavage à l'éther du précipité d'albumines totales, pratiqué comme l'indique Piettre, est peu utilisable lorsqu'on doit faire des dosages en série. De plus, l'éther tend à dénaturer les protides et les redissolutions dans l'eau se font de moins en moins bien. Nous avons également essayé d'augmenter le pouvoir précipitant de l'acétone en l'acidifiant, mais les résultats obtenus étaient peu encourageants. Finalement nous nous sommes arrêté à la technique suivante : adjonction, au moment de la reprécipitation par l'acétone de une à deux gouttes de chlorure de sodium à 1%, ce qui facilite considérablement la floculation. Après centrifugation la recherche des protides dans l'acétone surnageante reste négative.

Ayant donc adopté un procédé d'obtention des protides totaux qui les débarassait au maximum des lipides, nous avons également comparé les quantités de globulines obtenues après une, deux ou trois précipitations acétoniques. Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous (Tableau IV).

L'examen de ce tableau montre que :

1°) dans la plupart des cas il y a augmentation nette du poids de la globuline en passant de la première à la deuxième précipitation acétonique, les chiffres augmentant très peu de la deuxième à la troisième ;

Tableau IV.

Variation du taux de la globuline sous l'influence d'une délipidation à l'acétone plus ou moins poussée.

Les résultats sont exprimés en mmgr. par cc.

Espèce	I précipitation acétonique	II précipitations acétoniques	III précipitations acétoniques
Chien	20,9	27,8	30,9
	21,5	26,4	27,5
Chien	27,6	39,5	42,5
Chien	24,5	27,5	
Porc	28,5	29	
	28,5	29	
	22	25,5	
Porc	21,5	26,5	
	21,5	26	31
Cheval	29,5	48,5	30
Cheval	29,5		
	29,6		
Lapin	16,5	25,5	51.4
Lapin	21	30	
Mouton	39	38	
		39	
Bœuf	33	41,5	
	32,5	42	
Homme normal	32,9	37,5	
	32,4	38,2	
Homme normal	33,5	39,5	
	34,5	38,5	
Homme normal	21,7	24,5	
Homme néphrose	23	24,8	
lipoïdique	23	25,3	24,5
		25,5	24,5
Homme néphrose	24,6	27,8	
lipoïdique	24	28,6	

2") dans les cas où il faut plusieurs précipitations acétoniques pour arriver au poids maximum de globulines précipitables par l'acide carbonique, *il ne s'agit pas toujours de sérums où la lipémie est la plus forte.*

Cette dernière constatation est importante, nous en conclurons que ce ne sont pas les quantités absolues de lipides libres qui nécessitent l'application à un sérum de précipitations acétoniques répétées, *c'est seulement la proportion de lipides engagés dans des complexes.*

Pour nous assurer de ce dernier point, nous avons fait des expériences basées sur le raisonnement suivant : si les lipides empêchent la précipitation des globulines, ce n'est pas seulement par leur seule présence, mais par le fait qu'il peut exister entre eux et la globuline des liaisons faisant varier les caractères de précipitabilité de cette dernière (point isoélectrique). Un sérum étant, délipidé au maximum par trois précipitations acétoniques successives, on y dose les globulines par l'acide carbonique sur une première fraction. On ajoute à une deuxième fraction identique une certaine quantité de «gliode» préparé selon MACHEBOEUF : à savoir un complexe lipides-sérine. On tente alors de précipiter les globulines par le gaz carbonique. A un troisième échantillon, on ajoute une quantité de sérine équivalente à celle qui était engagée dans le gliode introduit dans la portion deux. Voici deux exemples de ce type d'expériences (Tableau V).

D'autre part nous avons vérifié que l'introduction d'une émulsion stable de lécithine (1 cc. d'une émulsion contenant 100 mmgr. de lécithine) n'empêche en rien la précipitation de la globuline. La lécithine libre est même entraînée par les globulines, il faut laver celles-ci plusieurs fois à l'éther pour les en débarrasser et obtenir un chiffre analogue aux témoins.

On voit donc que la présence de lipides ou de sérine libres dans le milieu ne suffit pas à empêcher la précipitation des globulines par l'acide carbonique et que seul le complexe sérine-lipide a un pouvoir empêchant. Il faut admettre qu'au moment où nous avons introduit dans le sérum délipidé le gliode de MACHEBOEUF il s'est formé un complexe globuline-sérine-lipides

Tableau V.

Influence des lipides engagés à l'état de gliode sur la précipitation des globulines par le CO2. (Résultats en mmgr. par cc.)

Espèce	Sérum dilué 10 fois — CO^2	Sérum délipidé			
		CO^2 direct	2cc de gliode puis CO^2	3cc de gliode puis CO^2	3cc de sériine puis CO^2
Poule	12	21,5 22 22	9,5 9,0	8	22
Porc	7	33,5 33	8,5	8,5	33,7 32,7

ce qui est rendu possible par le pH de ce sérum compris entre 7,5 et 8. Le point isoélectrique de ce complexe est tel qu'en réalisant par saturation au gaz carbonique un pH de 5,5 dans le milieu, on ne peut en libérer la globuline.

On pouvait se demander si les globulines précipitées après 1 ou 3 délipidations par l'acétone avaient toujours même composition ou s'il ne s'agissait pas de protides différents. Pour répondre à cette objection nous avons, sur du sérum de cheval, préparé une quantité suffisante de globulines par saturation au gaz carbonique après 1 traitement ou 3 traitements à l'acétone. Ces globulines soumises à l'analyse ont donné les résultats suivants en grammes pour 100 grs secs (1).

	1 précipitation acétonique	3 précipitations acétoniques
Azote	15,12	15,39
Soufre	0,783	0,782
$\frac{\text{Azote}}{\text{Soufre}}$	0,0518	0,051
$\frac{\text{Azote cystine}}{\text{Azote total}}$	2,27	2,24

(1) Azote par le Kjeldahl ; soufre après combustion suivant *Vila* et *Ancel* et dosage par benzidine suivant *Pohorecka-Loelesz*.

TECHNIQUE DE DOSAGE DES PROTIDES TOTAUX ET DES GLOBULINES DU SÉRUM DE pH 5,5. (LIBRES OU PRIMITIVEMENT ENGAGÉS DANS DES COMPLEXES LIPOPROTIDIQUES).

Dans un tube de centrifugeuse conique de 20 cc. on introduit à l'aide d'une pipette d'OSTWALD ou de CORNEC soigneusement essuyée à l'extérieur 1 cc. de sérum non hémolysé, 1 cc. d'eau bidistillée ne contenant pas de CO^2, refroidie dans l'eau glacée. On introduit ensuite 10 cc. d'acétone pure et sèche. On centrifuge instantanément 30 secondes à 2.500 tours, on décante, on redissout le précipité dans 2 cc. d'eau bidistillée froide et on reprécipite par 14 cc. d'acétone pure (également refroidie) en présence de 2 gouttes de solution de NACL à 1%. La troisième précipitation est faite dans les mêmes conditions. On centrifuge après la troisième précipitation (5 minutes), on décante l'acétone, on essuie les parois intérieures du tube avec un papier filtre enroulé sur un agitateur. On sèche à 40° pour que l'acétone du précipité s'évapore doucement, sans qu'il se fasse de projection, puis quelques heures à 100°, jusqu'à poids constant. On a ainsi par pesée les protides totaux. (Les opérations du début doivent être conduites très rapidement, afin que la redissolution soit facile). Pour précipiter les globulines un autre centimètre cube de sérum est traité de la même manière dans un tube taré, mais la deuxième ou la troisième précipitation acétonique est suivie dans ce cas d'une courte centrifugation pour permettre la remise en solution facile dans 10 cc. d'eau bidistillée du précipité de protides totaux. La solution obtenue on introduit une trace d'alcool octylique et l'on fait passer pendant 10 minutes un courant de gaz carbonique, on centrifuge, on décante, on essuie les parois du tube avec un papier filtre comme ci-dessus. On sèche à 100° et on pèse avec les précautions d'usage. On a ainsi le poids des globulines.

La sérine est obtenue soit par différence entre les protides totaux et la globuline, soit directement en recueillant quantitati-

vement le liquide surnageant les globulines et en précipitant par l'alcool à l'ébullion ou par un excès d'acétone contenant quelques gouttes de NACL à 1%. On centrifuge le précipité obtenu dans un tube taré, on le sèche à 40° puis à 100° et on le pèse.

Examinons les résultats obtenus par l'emploi de cette technique. (Tableau VI.)

I) PROTIDES TOTAUX.

A) On voit que pour les protides totaux, la concordance des résultats, en pratiquant la méthode sur divers échantillons du même sérum, est excellente.

B) *Signification des valeurs obtenues pour les protides totaux.*

Le but que nous nous proposions dans ces expériences quantitatives était évidemment le même que celui qu'avaient cherché à atteindre tous nos devanciers:

1°) ne doser que les protides totaux;

2°) les doser totalement.

1°) Nous pouvons facilement démontrer que nous dosons bien la totalité des protides du sérum. En effet, après trois précipitations acétoniques, si on a pris soin d'ajouter assez de chlorure de sodium pour avoir une floculation totale avec limpidité parfaite de l'acétone surnageante, l'adjonction de précipitants énergiques des protides comme l'acide trichloracétique ou le réactif de TANRET (1) ne donne rien ou une erreur qui n'atteint pas 2%. Au contraire, si nous examinons ce qui se passe avec les techniques couramment employées, comme celle d'ABRAMI-LAURENT, nous verrons que les lavages auxquels sont soumis les précipités tant de protides totaux que de globulines comportent des pertes importantes: une partie des précipités se redissout inévitablement. On peut s'en assurer en gardant tous ces liquides de lavage, les réunissant et recherchant leur teneur en protides.

(1) Ces essais sont fait après évaporation de l'acétone.

Tableau VI.

Comparaison des résultats obtenus après trois traitements à l'acétone et précipitation des globulines par CO^2, avec les méthodes de KAYSER, de LAURENT-ABRAMI et GRIGAUT.

Les résultats sont exprimés en milligrammes par cc.

ESPECE	ACET. + CO^2			Laurent-Abrami			KAYSER			GRIGAUT
	A.T.	Gl.	Sér.	A.T.	Gl.	Sér	A.T.	Gl	Sér.	A.T.
Mouton	77	**38**	38				82,9	**37,6**	45,3	73
	76	**39**								
Bœuf	75,3	**48,1**	27	73,7	**40,3**	33,4	83,08	**45,8**	37,28	**75,5**
	75,2	**48,8**		73,9	**41,5**	32,4	82,6	**45,6**	37	
	75,9									
Bœuf	91,5	**42,5**	48,7				93,8	**42,4**	51,4	
	92	**43,5**								
Poule	54,9	**30,7**	24,1	54	**34,5**	19,5	59,4	**38,4**	21,25	54,2
	54,6	**30,2**					59,3	**37,8**		
	54									
Poule	55,3	**30,4**	24,9	51,4	**29,7**	21,7	56,4	**28,8**	27,6	
Porc	70,4	**29,3**		71,3	**33,3**	38	75,5	**40,1**	35,4	70,7
	70,5	**29,4**	41	71,6	**32,5**	39,1	76,3	**39,7**	36,6	
	70,6									
Lapin	79,9	**33,8**	46,4	73,7	**32,1**	41,6	77,1	**37,02**	40,08	
	78,4	**31,7**		73,8	**32,2**	41,6				
Mouton	69	**41,3**		67,7	**31,1**	36,6	76,8	**34,7**	42,1	70,5
	70	**41**	28,75	68,6	**31**	37,6				
	70,6									
Mouton	75,2	**36,7**	38,5	65,5	**29**	36,5				
Chien	76,25	**28,9**	47,35	70,4	**29,8**	40,6	74,9	**26,9**	48,0	76,9
Chien	59	**23,6**	35,4	56,2	**17,8**	38,4	60	**20,8**	39,2	
Lapin	68,2			63,1			67,6			66,
				64,5						
Homme	64	**29,6**	33,5	61,1	**23,36**	37,74	65,5	**24,8**	40,7	63,1
normal	65,1	**29,4**		61,1	**23,04**	38,06	65,5	**24,8**	40,7	
Homme	69,5	**33,9**	35,6	70,9	**31,6**	39,3	74,7	**37,5**	37,2	70,35
normal		**33,9**		69	**32,8**	36,2				
Homme	45	**27,8**	17,3	43,8	**29,2**	14,6				
(néphrose	45	**28,6**								
lipoïdique)										

Si nous examinons la seconde des techniques que nous avons prise comme point de comparaison, celle de KAYSER, nous voyons que l'emploi de l'alcool-acétone ne donne pas de pertes sur les protides totaux.

2°) Le précipité que nous considérons comme étant exclusivement constitué par les protides totaux ne contient-il vraiment aucune impureté? Si on veut bien se reporter au tableau VII, on verra quelles proportions de lipides et de sels se retrouvent dans nos précipités de protides totaux après trois précipitations acétoniques successives: les quantités sont très faibles. Dans la méthode de KAYSER qui fournit des protides totaux plus élevés, la quantités d'impuretés entraînées est comme il fallait s'y attendre, plus grande qu'après trois acétoniques.

Nous ne pouvons prétendre évidemment à l'obtention de précipités aussi débarrassés de lipides et d'électrolytes que ceux fournis par l'extraction à l'alcool bouillant dans un KUMAGAVA. Les valeurs ainsi obtenues sont évidemment des standards auxquels GRIGAUT et ses collaborateurs ont parfaitement raison de se référer. Mais une telle technique ne se prête pas aux nécessités de l'expérimentation, dès qu'il s'agit d'exécuter en série un très grand nombre de dosages.

De tous les auteurs qui ont étudié le dosage des protides totaux, ce sont certainement BIERRY et VIVARIO qui se sont le plus préoccupés d'arriver à l'isolement des matières protéiques les plus pures possible. Eux aussi ont commencé par précipiter les protides totaux par l'acétone, mais dans des conditions, où la quantité de lipides soustraits est très inférieure à celle entraînée par trois acétoniques. Les protides obtenus sont redissous dans le chlorure de sodium, reprécipités à chaud par l'acide acétique à pH 5,5 et lavés abondamment à l'eau bouillante. On a ainsi des protides très purs, mais nous avons pu vérifier par maints dosages que cette purification entraîne de très grosses pertes au moment des lavages. C'est pourquoi nous n'avons pas employé cette technique comme méthode de comparaison.

Tableau VII.

Comparaison de la teneur en cendres et en lipides des protides totaux obtenus soit par une précipitation alcool-acétone (KAYSER) soit par 3 précipitations acétoniques.

ESPECE	Une précipitation alcool-acétone					Trois précipitations acétoniques				
	ALBUMINES TOTALES par cc, de sérum	CENDRES contenues dans 100 gr. d'A. T.	LIPIDES contenus dans 100 gr. d'A. T.	Poids sec de l'alcool acetone	Recherche de l'albumine dans l'alcool acetone	ALBUMINES TOTALES par cc. de sérum	CENDRES contenues dans 100 gr. d'A. T.	LIPIDES contenus dans 100 gr. d'A. T.	Poids sec des liquides acetoniques reunis	ALBUMINE contenue dans l'acetone pour 100 gr. d'A. T.
Porc	65,3	2,7	0,97	10,7	+	63,5	2,3	0,26	12,5	1
Chien	74	2,54	1,05	16,2	+	73	1,3	0,56	17,2	0,9
Bœuf	79,6	2,45	0,80	11,5	+	77,4	2,2	0,43	13,5	1
Lapin	85,1	1,87	0,93	14,1	+	84	1,5	0,26	15,2	0,85

II) GLOBULINES.

Ici encore, l'examen du tableau VI montre que pour un même sérum la méthode que nous proposons est parfaitement concordante avec elle même.

Que voit-on si on compare les résultats fournis par les trois techniques que nous avons étudiées?

Dans presque tous les cas, la méthode d'ABRAMI-LAURENT donne pour les globulines des valeurs plus basses que les autres méthodes; les chiffres de la technique de KAYSER se rapprochent davantage des nôtres, mais pour certaines espèces ils sont plus élevés, pour d'autres au contraire ils sont inférieurs. Les écarts varient non seulement d'une espèce à l'autre, mais encore dans une espèce, suivant les individus considérés. Qu'en conclure?

Ces constatations soulèvent évidemment des questions du plus haut intérêt, non seulement du simple point de vue analytique, mais encore et surtout du point de vue théorique. Quelle est donc la méthode standard de dosage des globulines? Quels caractères doit présenter une telle méthode pour mériter ce nom? Ceci fera l'objet d'un chapitre ultérieur que nous ne voulons pas introduire dès maintenant, pour ne pas rompre l'ordre logique d'exposition et de justification de notre technique personnelle. Disons simplement que la discussion de la valeur de ces techniques nous conduira à la conclusion suivante: *La méthode à l'acide carbonique que nous avons instituée est la seule qui dose la totalité des globulines de point isoélectrique = 5,5, qu'elles soient ou non initialement engagées dans le sérum à l'état de complexes et elle ne dose qu'elles.*

III) SÉRINE,

Avec notre technique personnelle on obtient pour la sérine les mêmes valeurs qu'on la dose par différence, ou directement par précipitation du liquide de centrifugation après élimination des globulines.

Soulignons dès maintenant que *la sérine* ainsi dosée correspond *à l'ensemble des protides sériques dont le point isoélectrique correspond à un pH plus acide que 5,5.*

Nous établirons plus loin que la sérine isolée par notre méthode est un mélange de deux constituants :

la sérine vraie,

la myxoprotéine de PIETTRE.

Nous indiquerons en même temps comment on peut, par une technique simple, *les séparer quantitativement,* et par suite les doser isolément dans les sérums normaux ou pathologiques. PIETTRE et son élève ARCAND ne sont jamais parvenus à réaliser à coup sûr cette séparation et ce dosage.

CONCLUSION :

La technique que nous proposons dose avec exactitude :

les protides totaux du sérum,

les globulines de pHi = 5,5 (point isoélectrique),

le mélange de myxoprotéine et de sérine vraie,

que les auteurs, n'ayant pu jusqu'ici fractionner d'une façon satisfaisante, ont englobé sous le nom de Sérine.

DEUXIÈME PARTIE.

SUR LA NATURE DES CORPS PRÉCIPITÉS SOUS LE NOM DE GLOBULINES PAR LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES.

Si l'on veut comparer utilement les résultats fournis par les différents procédés que nous avons utilisés dans la première partie de ce travail pour doser les globulines, il faut évidemment:

1°) les appliquer à des objets identiques ,c'est-à-dire à des sérums ayant subi les mêmes manipulations.

2°) examiner si les méthodes de dosage employées relèvent des mêmes principes.

1°) Nous avons vu que la précipitation des globulines par l'acide carbonique appliquée au sérum directement, ou après une délipidation maximale, donnait des résultats qui pouvaient varier dans la proportion de 1 à 10. Le rôle empêchant que jouaient les lipides se retrouve-t-il quand il s'agit de la précipitation des globulines par les sels?

Pour répondre à cette question nous avons comparé les résultats donnés sur un même sérum par les méthodes de KAYSER et de LAURENT-ABRAMI avant et après délipidation. La délipidation était obtenue soit par un traitement à l'acétone suivi d'un traitement à l'éther, soit par 2 ou 3 précipitations acétoniques. Dans les deux cas, après redissolution des protides totaux dans un volume d'eau double de celui du sérum employé, on chassait le solvant dissout par un barbotage d'air avant d'ajouter les sels.

Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau VIII

Tableau VIII.

Comparaison du taux des globulines obtenues par le C02 ou les méthodes de KAYSER, de LAURENT-ABRAMI sur des sérums délipidés ou non par l'acétone :

ESPÈCE	Acétone et CO^2			Laurent-Abrami						Kayser						Remarques
				direct			dilipidé			direct			dilipidé			
	A.T.	Sérine	glob.	A.T.	S.	G.	A.T	S.	G.	A.T.	S.	G.	A.T.	S.	G.	délipidation obtenue par
Poule	55,3	24,9	**30,4**	51,4	21,7	**29,7**	49,4	10,6	**38,8**	56,4	27,6	**28,8**	55,3	23,2	**32,1**	2 traitements à l'acetone
Porc	80,1	41,9	**38,2**	78,3	38,3	**40**	78,2	30,2	**48**	85	40,3	**44,7**	80,1	29,	**51,1**	id.
	80,1			78,5	36,9	**41,6**	78,7	32,4	**46,2**							
Porc				69,4	38,7	**31,2**	65,2	23,6	**41,2**	75,2	39,4	**36,7**	70,2	20,1	**50,3**	1 trait. à l'acet.
				69,9	39,7	**29,7**	63,5	22,9	**40,6**	75,9	38,3	**36,7**	71	20,5	**50,3**	1 trait. à l'éther
Porc	82	33	**49**	72,4	42,7	**29,7**			**36,8**							2 traitements à l'acetone
Bœuf				72,3	33,4	**38,9**	69,1	17,4	**51,7**	75,3	35,6	**39,7**	74,1	18,5	**55,9**	1 trait. à l'acet.
																1 trait. à l'éther
Chien	59	35,4	**23,6**	56,2	38,4	**17,8**	55,2	22,8	**32,4**	60	39,2	**30,8**	57,2	21,6	**35,6**	id.
Mouton	75,2	35,2	**36,7**	65,5	36,5	**29**	63	13,1	**50**							id.
Homme normal			**44**			**39,5**			**46**							1 traitement à l'acetone
Homme néphrose	45,35	11,8	**33,5**	38,5	14,8	**23,7**	39	9,2	**29,9**							3 traitements à l'acetone
Homme normal	82,6	47,3	**32.2** **32,5**	82	50,7	**31,3**	79,6	35,1	**44,5**							id.

L'examen de ce tableau montre :

A). que *dans tous les cas les globulines augmentent* et que *cette augmentation est souvent considérable ;* donc, ici encore, une partie de ces protides se trouvait avant la délipidation sous une forme telle que ses caractères de précipitabilité étaient modifiés.

B). que dans la majeure partie des cas les poids de globulines obtenus par précipitation saline *dépassent* ceux fournis par l'acide carbonique sur un sérum ayant subi la même délipidation (1).

La première conclusion à laquelle conduisent ces faits est que *l'application directe au sérum des méthodes de précipitation des globulines par les électrolytes n'est pas recevable, une partie plus ou moins grande de ces protides étant engagée dans des complexes que même les sels à forte concentration ne peuvent scinder.* L'influence des lipides du sérum devra donc être toujours éliminée préalablement par des précipitations acétoniques, si on veut comparer soit des sérums normaux et pathologiques, soit les sérums normaux de divers individus d'une même espèce. On s'expose, en n'opérant pas ainsi, à voir des variations de la teneur en globulines là où il n'y en a point, et où seul varie l'état de liaison de ce protide avec d'autres constituants du milieu.

La deuxième conclusion est que même appliquées à différentes fractions d'un même sérum délipidé, les différentes techniques ne donnent pas les mêmes résultats. Ceci nous conduit à examiner le deuxième point : ces techniques relèvent-t-elles des mêmes principes théoriques ?

2°) La méthode au gaz carbonique est basée sur la définition suivante des globulines : *protides dont le point isoélectrique est de* 5,5. Il est certain que la meilleure définition de la globuline serait tirée de sa constitution chimique, après un isolement

(1) *Remarque.* Dans la méthode de *Kayser* on se rappelle que les globulines sont obtenues par *différence* entre les protides totaux (alcool-acétone) et la sérine dosée sur le filtrat des globulines précipitées par S04 Mg. Or on constate qu'après délipidation du sérum, le filtrat des protides totaux contient encore des albumines ; donc le chiffre des globulines obtenu par différence est entaché d'une erreur en moins, le dosage de la sérine par coagulation acide-formol à pH 4,7 restant exact.

quantitatif ; à l'heure actuelle, les données sur la composition des globulines des différentes espèces sont si restreintes qu'il faut se contenter comme la majeure partie des auteurs d'une définition physico-chimique.

Par le gaz carbonique, réalisons-nous dans les sérums délipidés un pH constant et voisin du pHi des globulines? Oui, comme le montrent les résultats consignés dans le tableau IX.

Tableau IX.

pH réalisé en saturant par le CO^2 les sérums délipidés par 3 précipitations acétoniques. (Les pH sont déterminés par l'appareil de MISLOWITZER, avec électrode à la quinhydrone).

ESPECE	pH
Bœuf	5,48
Mouton	5,54
Chien	5,52
Lapin	5,59
Porc	5.64

Remarquons d'ailleurs que le pH réalisé par saturation au gaz carbonique sur du sérum non délipidé est le même (voisin de 5,5) et que par conséquent c'est bien l'existence de complexes qui empêchent la précipitation de la globuline.

b) *Pour les méthodes de précipitation saline*, le problème est beaucoup moins nettement posé. Il s'agit en effet de la précipitation d'un sol par un électrolyte, phénomène complexe où interviennent et la concentration, et la charge l'électrolyte employé. Pour qu'il y ait floculation il faut que la concentration dépasse une certaine limite inférieure au-dessus de laquelle la précipitation est rapidement totale ; d'autre part les ions agissant par leurs charges, les sels neutres dont les 2 ions sont polyvalents seront plus actifs pour une même concentration moléculaire. Les sels n'agissent pas simplement en déplaçant le pH de la solution du colloïde pour l'amener vers le pHi (ce qui n'a d'ailleurs pas lieu pour tous les sels), mais encore et surtout ils modifient le potentiel cri-

tique (effet dépresseur) et tendent à l'amener dans la région du pH de la solution — ces deux effets convergent par conséquent pour hâter la floculation du sol (élargissement de la zone de floculation F. Vlès).

D'autre part, étant donné qu'il y a dans le sérum plusieurs colloïdes, on peut prévoir que si l'on ne cherche pas à rompre les complexes qu'ils forment entre eux, un protide pourra très bien floculer à la faveur de sa liaison avec un autre, et cela pour une concentration en électrolytes qui serait insuffisante pour le précipiter s'il était seul.

En résumé, du point de vue physicochimique notre méthode personnelle à l'acide carbonique et les techniques qui emploient la précipitation par les électrolytes mettent en œuvre des processus différents, mais dont l'un seulement est parfaitement défini : le nôtre. Si l'on pouvait définir les globulines par les concentrations en électrolytes susceptibles de les précipiter des solutions où elles existent à l'état libre, les techniques de Kayser et de Laurent devraient donner les mêmes résultats ; or, il n'en est rien. Les différences entre ces procédés si elles sont plus faibles en l'absence de lipides dans le sérum, subsistent encore. Cet ensemble de considérations suffirait déjà à assurer la supériorité de notre technique sur les autres, mais nous avons pu mettre en évidence un fait nouveau : à savoir que la myxoprotéïne n'est pas précipitée par le gaz carbonique, *les électrolytes au contraire l'entraînant quantitativement avec les globulines dans les sérums délipidés.*

TROISIÈME PARTIE.

RECHERCHES CONCERNANT L'ISOLEMENT DE LA MYXOPROTÉINE DE PIETTRE.

Dans la première partie de ce travail nous avons déjà eu l'occasion de parler du protide sérique isolé par M. PIETTRE et auquel il a donné le nom de *myxoprotéïne*.

C'est un protide ayant les caractères suivants : insoluble dans l'eau distillée ; soluble dans le chlorure de sodium à 9 0/00 ; teneur en azote : 14,7% ; teneur en soufre : 1,1%. On peut dire qu'il n'existe pas à l'heure actuelle d'analyses donnant la teneur en acides aminés de cette substance.

PIETTRE et ARCAND se sont efforcés de séparer à l'état pur ce protide, puis de le doser. Quel est le principe de leur séparation ? Le sérum est délipidé par précipitation acétonique ; le précipité obtenu est lavé à l'acétone puis à l'éther. On le redissout dans 1 vol,3 d'eau. Par *tâtonnements* on recherche la quantité d'acide chlorhydrique N/100 à ajouter pour avoir la floculation de la globuline. Elle commence à précipiter, d'après ARCAND, à pH 7,27, et serait d'après lui maximale pour tous les pH compris entre 6,68 et 5,2 (sur un même sérum) ! Le précipité est centrifugé. Le liquide surnageant est précipité à son tour par un volume d'acétone ; on centrifuge ; on reprend le culot par l'eau distillée. La sérine se dissout ; la myxoprotéïne reste insoluble. La solution obtenue, qui contient la sérine plus un reste de myxoprotéïne est alors soumise dans les mêmes conditions à une série de précipitations acétoniques suivies de redissolutions. Elles ont pour but de séparer les quantités de myxoprotéïne qui auraient échappé à la première séparation.

Si l'on admet l'existence de la myxoprotéïne en tant qu'espèce chimique — SOERENSEN dans ses derniers travaux n'en fait pas mention — il est fort possible que ce protide, présent d'après PIETTRE dans le sérum de toutes les espèces animales, et dans une proportion très variable, joue un rôle important dans l'édification des complexes sériques. Actuellement les travaux faits sur la question ne permettent pas de s'en convaincre.

La lecture de la thèse d'ARCAND donne l'impression que si la technique de dosage de la myxoprotéïne n'a pu être fixée d'une façon satisfaisante, c'est que le procédé employé par l'auteur pour précipiter les globulines, n'est pas bon. Or, ARCAND (loc. cit. page 32) dit que «la séparation de la myxoprotéïne dépend de la complète élimination de la globuline». Cette séparation serait, d'après lui, surtout difficile dans le cas des sérums pathologiques. Admettons même que l'auteur soit arrivé dans quelques cas à une séparation intégrale des globulines, — ce dont nous doutons —, il n'est en tout cas parvenu qu'après des précipitations répétées à l'acétone — il en faudrait parfois 7 d'après lui — à séparer la myxoprotéïne d'avec la sérine.

Le travail d'ARCAND est bien peu satisfaisant du point de vue physicochimique; il suffit de lire par exemple les pages 29, 30, 31 de sa thèse pour s'en convaincre. Nous ne voulons pas entrer ici dans la discussion des conceptions que PIETTRE, et ARCAND après lui, se font des protéïnes du sérum et de leurs propriétés physiques. Nous doutons fort qu'aucun spécialiste de ces questions se rallie à leur opinion en contradiction formelle, d'après eux-mêmes, avec les travaux de Jacques LOEB.

Nous avons été conduit à nous demander ce que *devenait la myxoprotéïne dans l'application de notre technique*. Précipite-t-elle avec les globulines à un pHi de 5,5? Reste-t-elle en solution avec la sérine? On ne saurait le dire à priori; son point isoélectrique n'a pas été déterminé; ses caractères de solubilité sont intermédiaires entre ceux de la sérine et de la globuline; sa teneur en soufre est par ailleurs, intermédiaire également entre celles de la sérine et de la globuline, et on ne peut guère trancher par l'analyse chimique élémentaire l'identité d'un corps qui à

défaut de caractères de constitution vraiment spécifiques devrait tout au moins être défini par des caractères physico-chimiques bien déterminés.

Nous pensons que les globulines caractérisées par nous comme précipitant au pHi = 5,5 constituent bien un groupe homogène puisque nous l'avons dit plus haut, après une, deux ou trois délipidations acétoniques du sérum la quantité qu'on en isole va en augmentant sans que la constitution chimique change; le rapport Soufre/Azote ne varie pas. Si nos globulines étaient mélangées de myxoprotéine — dont la teneur en soufre est de 1,1 à 1,2 pour 100 grames secs — nous aurions obtenu pour ces protides des teneurs en soufre supérieures à 0,8% .Nous étions donc fondés à chercher la myxoprotéine dans la solution de sérine. Pour faire cette recherche nous nous sommes basés sur l'idée suivante: étant données les propriétés de la myxoprotéine, *son point isoélectrique doit être intermédiaire entre ceux de la globuline et de la sérine.*

Tableau X.

Quantités de myxoprotéine obtenues en fonction du pH réalisé au moment de la précipitation par l'acétone. Résultats en milligrammes par centimètres cubes de sérum:

pH	Chien Myxoprotéine	pH	Mouton Myxoprotéine	pH	Homme Myxoprotéine
4.8	6	4,8	7,4	4,8	2
4.9	8,4	4,9	10	**4,9**	**14,5**
5	**12**	**5**	**13**	5	traces
5,1	8,4	5,1	9,5	5,1	0
5,2	7,2	5,2	0		
5,3	4,4				

Sur un sérum délipidé par 3 précipitations acétoniques, on enlève les globulines par saturation au CO^2; on prélève des parties

aliquotes égales du liquide surnageant, et on leur ajoute des solutions tampons (acétates) pour amener leur pH à : 5,4 ; 5,3 ; 5,2 ; 5,1 ; 5 ; 4,9 ; 4,8 : On ajoute alors dans chaque tube un volume d'acétone et on centrifuge. On reprend les culots par un volume d'eau distillée contenant le tampon correspondant. La sérine se redissout totalement dans tous les tubes, mais on retrouve d'autant plus de myxoprotéine insoluble que le pH de floculation était plus voisin du pHi de ce protide. Comme dans le cas du procédé de PIETTRE, nous avons pu remarquer que cette myxoprotéine se présentait sous l'aspect de flocons gris très différents du précipité blanc et grenu de globulines. Avec cette technique nous avons constaté que le pHi (1) de la myxoprotéine était compris pour les cas étudiés entre 4,9 et 5,1 et que sa marge de précipitation était extrêmement étroite. Ceci est en accord avec la théorie de LOEB et en contradiction avec celle de PIETTRE (C. R. Acad. *186* page 1657).

Quelques exemples des recherches que nous avons faites figurent dans le tableau X.

Dans un cas, sur du sérum de cheval, nous avons fait l'analyse de la myxoprotéine et de la globuline obtenues par ce procédé après 1 ou 3 précipitations acétoniques. Voici les résultats en grammes pour 100 grs secs.

	1 précipitation acétonique		3 précipitations acétoniques	
	Globuline	Myxoprotéine	Globuline	Myxoprotéine
Azote	15,12	14,55	15,39	13,96
Soufre	0,783.	1,2	0,782	1,125
N/S.	0,0518	0,0825	0,051	0,0813
N Cystine / N Total.	2,27.	3,61	2,24	3,5

La constance de ces chiffres montre que dans notre technique la myxoprotéïne passe totalement avec la sérine.

(1) Ce procédé de détermination du pHi n'a évidemment pas l'exactitude de celui fourni par le transport électrique, mais il suffisait pour le but à atteindre.

Que devient la myxoprotéïne dans les méthodes de précipitation des globulines par les électrolytes ?

Nous avons été frappé rapidement au cours de nos recherches par le fait suivant : sur un même sérum délipidé la différence entre les globulines obtenues par le sulfate d'ammonium et celles obtenues par le CO^2, est égale ou voisine de la myxoprotéine dosée par le procédé ci-dessus, (précipitation à pHi compris entre 4,9 et 5,1).

Nous avons donc fait quelques essais systématiques qui ont été conduits de la façon suivante :

On prend un échantillon assez important de sérum ; on fait trois précipitations acétoniques ou une acétonique suivie de lavages à l'acétone sèche et à l'éther. Les protides totaux sont redissous dans l'eau bidistillée, et sur la solution obtenue on fait des prises égales.

a) Sur une première prise on sépare les globulines par saturation au CO^2, puis la sérine et la myxoprotéïne par la méthode aux tampons, précipitation à pHi compris entre 4,9 et 5,1, ci-dessus décrite.

b) Sur une deuxième prise on précipite les globulines par la méthode au sulfate d'ammonium (Abrami-Laurent).

c) La troisième prise est utilisée ainsi : précipitation des globulines par le CO^2 ; on centrifuge ; dans le liquide surnageant on ajoute un volume de sulfate d'ammonium saturé. On pèse la quantité de protides ainsi précipités après les lavages nécessaires selon Abrami-Laurent.

Le tableau XI donne quelques exemples des résultats obtenus.

Les résultats du tableau XI montrent que les protides précipités par le $SO^4\ (NH^4)^2$ à demi saturation sur un sérum délipidé représentent la *globuline* et la presque totalité de la *myxoprotéine*. Cette conclusion est renforcée par la contre épreuve qui consiste sur le filtrat de précipitation des globulines par $SO^4(NH^4)^2$ à rechercher la myxoprotéine par la méthode aux tampons : *recherche qui s'est montrée être toujours négative.*

Nous ne nous dissimulons pas que nos expériences sur ce point particulier sont encore peu nombreuses et qu'elles doivent

Tableau XI.

Comparaison des taux de myxoprotéine obtenus, sur du sérum délipidé, par la méthode aux tampons et par le $SO^4(NH^4)^2$ après précipitation des globulines par le CO^2.

Espèce	Sérum naturel			Sérum délipidé par précipitation acétonique et lavages acé tone-éther								
	$SO^4(NH^4)^2$			$SO^4(NH^4)^2$			Méthode au CO^2			Myxoprotéïne par les tampons	Protide précipités par Laurent après enlèvement de la globuline par CO^2	Serine obtenue
												Après enlèvement de la myxoprotéïne	après pption par CO^2 et $SO^4(NH^4)^2$
	AT.	S.	GL.	AT.	S.	GL.	AT.	S.	GL.				
Homme	82.	52.7	31.3	79.6	35.1	44.5	82.6	50.4	32.2	14.5	14.2	34	33.6
Homme (néphrose lipoïdique)	38.5	14.8	23.7	40.2	9.2	31.	42.	12.5	29.5	1.6	1.3	10.9	11.2
Chien	65.56	36.5	29.06	63.	13.1	50.	71.8	35.2	36.6	13	12.5	22.7	14.8
Mouton	56.2	38.4	17.8	55.2	22.8	32.4	59.	35.4	23.6		9.2		

être étendues à un grand nombre de sérums normaux avant de conclure et de passer à l'étude des cas pathologiques.

Si nous les avons exposées dès à présent, c'est parce qu'elles nous paraissent donner la première indication d'un *dosage précis, basé sur des principes rationnels de la myxoprotéine dans les sérums.*

⁂

L'ensemble des résultats exposés dans la deuxième et troisième partie de nos recherches personnelles permet de comprendre pourquoi le dosage des globulines par les différentes techniques nous donne des résultats variables avec la méthode employée :

Si l'acide carbonique ne précipite jamais la myxoprotéïne que le sérum soit ou non délipidé, au contraire les électrolytes se comportent différemment. Employés sur le sérum naturel ils précipitent une *partie de la globuline* et *une partie de la myxoprotéïne,* employés sur le sérum délipidé ils dosent l'ensemble de ces 2 protides. Dès lors on comprend l'impossibilité qu'il y a à comparer, de façon rationnelle, ces techniques entre elles.

S'il y a un semblant de concordance entre la méthode au CO^2 (appliquée au sérum délipidé) et les méthodes aux électrolytes appliqués directement au sérum, c'est parce que les *sels précipitent peu ou pas la myxoprotéïne tant qu'elle est engagée dans des complexes.* Dès que les complexes sont détruits les sulfates donnent des chiffres très supérieurs à l'acide carbonique.

Pratiquement il suffirait donc pour doser dans un sérum les 3 protides principaux : globuline, myxoprotéine et sérine, d'opérer de la façon suivante : délipidation par 3 traitements à l'acétone :

dosage des globulines sur un échantillon par le CO^2,

dosage de la myxoprotéine sur le filtrat par la méthode des tampons ;

dosage des protides totaux sur un 3^e échantillon par l'acétone.

⁂

Ayant exposé l'ensemble de nos résultats, nous pouvons nous demander si nous avons atteint le but que nous nous étions proposé : d'une part la révision des techniques couramment employées pour séparer et pour doser les protides sériques, puis mise au point d'une méthode rapide, précise et indépendante des variations de composition du sérum ; d'autre part étude des complexes lipoprotidiques du sérum.

Nous pensons avoir nettement établi de quelles erreurs sont entachés les procédés actuellement utilisés pour le dosage de la sérine et de la globuline. Directement appliquées aux sérums, les méthodes basées sur l'emploi des électrolytes à forte concentration, ne dosent les globulines et la myxoprotéine en bloc, qu'autant qu'elles ne sont pas engagées dans des complexes. En fait ces méthodes ne deviennent exactes que si elles font suite à une délipidation, sinon les résultats obtenus sont faux du point de vue absolu comme du point de vue relatif. Les comparaisons faites entre les sérums normaux et pathologiques n'ont donc pas de sens ; ce que l'on a pris le plus souvent pour une variation quantitative de la globuline par exemple, n'est en réalité qu'un indice de la quantité de ce protide qui se trouve libre et par suite directement accessible au dosage. Le chiffre obtenu a un sens tout différent de celui qu'on lui attribue.

Nous avons mis au point, en utilisant certaines observations faites par nos devanciers, une technique qui permet, après délipidation et rupture des complexes lipidoprotidiques du sérum de doser exactement la sérine, la myxoprotéine et les globulines précipitables au pHi = 5,5. Le groupe de globulines que nous précipitons est donc physico-chimiquement beaucoup mieux défini que les globulines précipitées par les méthodes employant des électrolytes.

Nos résultats sont nettement en faveur de l'existence de complexes sériques dans lesquels la globuline serait engagée. On conçoit mal qu'elle puisse exister à l'état libre à côté du complexe lipides-sérine de MACHEBOEUF ; si dans un sérum délipidé dont le pH est passé de ce fait à 8 on introduit une certaine proportion de gliode, la précipitation par CO^2 des globulines de pHi = 5,5

devient immédiatement impossible. Le fait ne peut s'expliquer que par la formation d'une liaison globuline-gliode et ce complexe doit préexister dans les sérums normaux puisque les globulines n'y sont précipitables à pH = 5,5 qu'après élimination des lipides par l'acétone. Il existerait donc normalement un complexe secondaire de la forme :

(lipide + sérine) + globuline

Ce même raisonnement vaut pour la myxoprotéine de PIETTRE qui précipite par le sulfate d'ammonium quantitativement après délipidation, mal et toujours incomplètement dans le sérum initial. L'existence d'un complexe myxoprotéine + sérine indépendant de la présence de lipides est d'autre part bien probable étant donné la difficulté de séparation de ces deux protides.

En résumé : le plasma sanguin, comme le protoplasme est «un complexe de complexes» ; aucun des protides qui y entrent, n'y existe à l'état libre ; ils y sont associés non seulement entre eux, mais encore avec les lipides dont la solubilité dans l'eau devient, sans acceptation de ces notions, impossible à comprendre

L'intérêt de nos acquisitions expérimentales nous semble évident du point de vue de la pathologie, car elles permettent peut-être de saisir pourquoi en dépit du grand nombre de recherches qui ont été faites jusqu'ici sur les protides sériques, on n'est jamais parvenu à des systématisations intéressantes, donnant des indications diagnostiques. Nos recherches en cours montrerons qu'il importe moins de connaître la concentration de tel ou tel protide dans le sérum que la proportion de ce protide existant à l'état libre ou combiné. Dans ce cas le rapport «protide libre/protide total» deviendra le test d'une modification des constituants du milieu intérieur sous l'influence de l'agent pathologique et, pour être féconde, l'étude de ce rapport devra être rattachée à celle des propriétés physico-chimiques générales du sang.

CONCLUSIONS.

Ce travail entrepris dans l'intention d'étudier les complexes pouvant exister entre les lipides et les protides du sérum, nous a conduit aux conclusions suivantes:

I). La présence des lipides empêche la précipitation totale des globulines du sérum, soit par l'acide carbonique, soit par les sels qui sont cependant des précipitants plus énergiques. C'est l'existence de liaisons entre les lipides et les protides qui empêche l'isolement intégral des globulines; dès que les complexes sont détruits ces protides sont facilement isolés.

II). L'importance pratique de ces constatations nous a conduit à établir une technique de dosage de la globuline et de la sérine basée sur l'élimination, dans un premier temps des lipides. Nous avons mis au point une méthode rapide, précise, nécessitant une petite quantité de sérum, ayant ainsi tous les caractères d'une bonne méthode clinique. Elle consiste essentiellement 1°) à délipider le sérum par l'acétone; — 2°) à dissoudre le précipité obtenu dans l'eau distillée. Sur une partie de cette solution on précipite la totalité des protides par l'acétone en excès; sur une autre les globulines sont précipitées par le gaz carbonique à saturation. La sérine est déterminée par différence: elle n'est jamais entraînée avec les globulines.

III). La comparaison des résultats obtenus par diverses techniques sur les sérums de différentes espèces montre que parfois, même pour des sérums normaux, les valeurs obtenues par notre méthode différent de celles fournies par les procédés où l'influence des lipides n'est pas écartée.

IV). Nous avons établi que notre méthode diffère des techniques basées sur l'emploi des électrolytes en ce que nous précipitons toujours la totalité des globulines vraies à leur point iso-

électrique (pHi = 5,5) que réalise automatiquement dans nos conditions expérimentales la saturation par le gaz carbonique. Au contraire les sels précipitent outre les globulines vraies, la myxoprotéine de PIETTRE, en quantité variable selon qu'elle existe à l'état libre, ou combinée avec les lipides.

V). Nos constatations nous ont permis d'indiquer un procédé de dosage de la myxoprotéine : on l'obtiendrait par application, au filtrat obtenu après précipitation des globulines par le gaz carbonique, de la méthode dite aux tampons.

VI). L'ensemble des faits que nous avons observés parle en faveur de l'existence dans le sérum de complexes lipido-protidiques entre la globuline et la myxoprotéine d'une part, et les lipides d'autre part Ces complexes seraient à rapprocher de ceux isolés par MACHEBOEUF.

VII). L'existence de ces complexes dans le sérum normal et leurs variations quantitatives dans les cas pathologiques permet de comprendre pourquoi la simple évaluation du rapport sérine/globuline n'a pas conduit jusqu'ici à des constatations fructueuses. Il faudrait déterminer non seulement, comme on l'a tenté, les variations quantitatives de ces deux protides, mais surtout étudier leur mode de liaison, tantôt normal, tantôt anormal, avec les lipides du plasma.

Le Président de Thèse :
PR. MERKLEN

Vu : Le Doyen :
PR. MERKLEN

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université
Chr. PFISTER

BIBLIOGRAPHIE.

1. ABDERHALDEN E. — Hydrolyse des krystallisierten Serumalbumins aus Pferd (**Zschr. f. Phys. chem. 37** — 495 1902/1903).
   ABDERHALDEN E. — Hydrolyse des Edestin (**id. 37** — 499 — 1902/1903).
   ABDERHALDEN E. — Abbau und Aufbau der Eiweisskörper in tierischen Organismus (**id. 44** — 17 — 1905).
2. ABDERHALDEN E., PETER BERGELL et TH. DOERPINGHAUS. — Die Kohlehydratgruppe des Serumalbumins und des Eieralbumins (**id. 41** — 530-1904).
3. ABDERHALDEN E., et R. HAAS. — Weitere Beobachtungen über das physikalische Verhalten von Aminosäuren, Polypeptiden, 2—5 Dioxopiperazinen in verschiedenen tautemeren Formen von Proteinen (**id. 155** — 200 — 1926).
4. ABDERHALDEN E., et E. KOMM. — Ueber die Anhydridstruktur des Proteins (**id. 139** — 181 — 1924).
5. ABDERHALDEN E., et FR. SAMUELY. — Beiträge zur Frage nach Assimilation der Nahrungseiweiss im tierischen Organismus. (**id. 46** — 193 — 1905).
6. ABDERHALDEN E. et SLAVU. — Vergleichende Untersuchung über den Gehalt der Serumeiweisskörper verschiedener Blutarten an Thyrosin Glutaminsäure und an Glycocoll (**id. 5** — 247 — 1909).

7. ACHARD CH. et A. ARCAND. — Sur le rapport des protéines et des lipides dans le sérum sanguin, (**Cptes rend. de la Société de Biol.** 21 déc. 1929).

ACHARD CH. et A. ARCAND. — Etude comparée des protéines dans le sérum sanguin et les sérosités de la plèvre et du péritoine. (**Le Sang 4** — I — 1930).

ACHARD CH. et A. ARCAND. — Le phosphore lipidique accompagnant les globulines dans le sérum sanguin et les sérosités. (**Cptes rend. Acad. des Sciences 190** — 1209 — 1930).

8. ACHARD CH., BARIETY et CODOUNIS. — Equilibre protéique du sérum sanguin dans la méningite tuberculeuse (**Cptes rend. de la Société de Biol. 104** — 51 et 257 — 1930).

9. ACHARD CH., BARIETY et A. CODOUNIS. — L'équilibre protéique du serum comparé dans le sang de la mère et le sang du cordon ombilical (**id. 102** — 984 — 1929).

9a. ACHARD CH., BARIETY et A. CODOUNIS. — Variations de l'équilibre protéique du sérum dans la tuberculose pulmonaire. Sa valeur pronostique (**Cptes rend. Acad. de Médec.** oct. 1929).

10. ACHARD CH., BARIETY et A. CODOUNIS. — Deux cas de néphrose lipoïdique avec rémission prolongée (**Soc. méd. des hôpit.** mars 1931).

11. ACHARD CH., A. CODOUNIS et A. HOROWITZ. — Néphrose lipoïdique chez un tuberculeux; néphrite épithéliale avec lipoïdurie (**Cptes rend. Acad. de Médec.** mai 1931).

12. ACHARD CH., A. GRIGAUT, A. CODOUNIS. — Les variations pathologiques de la composition protéinique du sérum sanguin (**Bul. Soc. Chim. Biol. 12** — 417 — 1930).

12a. ACHARD CH., A. GRIGAUT, A. CODOUNIS. — La part des lipides dans le dosage réfractométrique des protéines du sérum (**C. R. Soc. Biol.** I mars 1930).

13. ACHARD CH., et M. PIETTRE. — Contribution à l'étude du sérum sanguin dans la néphrose lipoïdique (**Cptes rend. de la Soc. de Biol. 104** — 49 — 1930).

14. ACHARD CH., RIBOT, LEBLANC. — Le coefficient lipémique dans les hydropisies (**Cptes rend. de la Soc. de Biol.;** mars 1919).

15. ADLER A. — Plasma und serum. — **Handbuch Bethe** 6 — 250.

16. ADLER A. — Die physiologischen Schwankungen des Mischungsverhältnisses von Albumine und Globuline im menschlichen Blutserum (**Deutsch. Arch. klin. Med. 126** — 61 — 1918).

17. ADOLF M. — Ueber das Verhalten des Diphteriantitoxins bei der Elektrodialyse und seine Beziehung zum sog. Pseudoglobulin. (**Klin. Wochenschr. 3** — 1214 — 1924).

18. ADOLF M. et W. PAULI. — Untersuchungen an elektrolytefreien wasserlöslischen Proteinkörpern — II. Mitt. — Beziehung zu Kohlensäure I. (**Bioch. Zschr. 152** — 360 — 1924).

19. A. ARCAND. — Les protéines des humeurs — **Thèse de Paris 1930.**

20. ARND et HAFNER E. A. — Ueber die Refraktion der Serumeiweisskörper und die Individualität von Albumin und Globulin (**Bioc. Zschr. 167** — 440 — 1926).

21. BANG J. — Ueber die Labwirkung des Blutserums — (**Hofm. Beitr. 5** — 395 — 1904).

22. BÆCHER S. et MM. KOSIAN. — Die Eiweissbau, insbesondere das Globulin-Albumin-Verhältnis

(Eiweissquotient) in Immunseris (**Biochem. Zschr. 159** — 324 — 1926).

23. BACKER, LILIAN et A. CARREL. — Effect of age serum lipoïds and proteins (**Journ. of exp. med. 45** — 305 — 1927).
24. BARBOUR H. G. — The heat-regulating mechanism of the body (**Physiol. Rev. 1** — 295 — 1921).
25. BARRENSSCHEEN et MESSINER. — Zur chemischen characterisierung der Serumprotein (**Boc. zschr. 209** — 251 — 1929).
26. BAYLISS W. M. — The action of gum acacia on the circulation (**Journ. exp. Therap. 15** — 29 — 1920).
27. BECKMANN K. — Ödemstudien - III. Mitt. - Über das Blutödem Ultrafiltrationsversuche am Blutserum Ödematoser (**deutsch. Arch. klin. med. 145** — 221 — 1924).
28. BEFANTIS. — Über Lipoïde und deren Beziehungen zu den Eiweisskörpern und zur Immunität (**Zschr. f. Immunitätsforschr. u. exp. Ther. 56** — 449 — 1928).
29. BELT A. E. — H. P. SMITH et G. H. WHIPPLE. — III Factors concerned in the perfusion of living organs and tissues. Artificial solutions substituted for blod serum and the resulting injury to parenchyma cells (**Amer. journ. Physiol. 52** — 101 — 1920).
30. BENEDETTI P. — La deviationi della formula proteica del sangue. La determinazione della fibrinenia a scopo clinico. Rivista recostrutiva con ricerche originali (**Arch. di patol. e clin. med. — 4** — 213 — 1925).
31. BENEDICT STANLEY R. et ELEANOR B. NEWTON. — The use of molybdicacid a precipitant for blood proteins (**Journ. of biol. chem. 82** — 1929 et **83** — 357 — 1929).

32. BERG W. N. — Determination of coagulation protein in serum (**Journ. of labor. a clin. med. 6** — 223 — 1921).

33. BLUM L. et GRABAR. — Influence de la minéralisation sur la pression osmotique des albumines du sang (**C. R. Soc. Biol.** p. 530 — 1928).

34. BERGER W. — Über die Hyperproteinämie nach Eiweissinjektionen. Ein experimenteller Beitrag zur Pathologie des Serumproteins und zur Proteinkärpertherápie (**Zeitschr. gesammt. exper. Med. 28** — 1 — 1922).

35. BERGER W. — Die Versuche zur Isolierung und zur Analyse der Antikörper (**Klin. woch. 2** — 1176 et 1226 — 1923).

36. BERGER W. — Die Beeinflussung des zellulären und humoralen Eiweissbestandes durch Krankheiten (**Wiener klin. Woch. 37** — 771 — 804 — 831 — 1924).

37. BERGER W. et R. UNTERSTEINER. — Die Beeinflussung der Eiweisskörper durch Inkubation, Fieber und Rekonvaleszenz akuter Infekte. Untersuchungen bei Malariatherapie der Paralyse (**Wiener arch. f. inn. med. 9** — 273 — 1924.

38. BERGER W. et R. UNTERSTEINER. — Morphologische und serologische Blutuntersuchungen im akuten und chronischen Stadium der Encephalitis epidemica (**Wiener arch. f. inn. med. 9** — 1 — 1924).

39. BERGER W. et L. PETSCHACHER. — Vergleichende Untersuchungen zur Mikro-Eiweissanalyse des Blutserums (**Zeitschr. gesmmt. exper. Med. 36** — 258 — 1923).

40. BERGER et L. BLEYER. — Beiträge zur Chemie pathologischer Organe und zu Beziehungen

zwischen Organen und Körpersäften (**Zeitschr. gesammt. exper. med. 45** — 385 — 1925).

41. BLEYER L. et W. BERGER. — Studien zur Chemie normaler Organe (**Zeitschr. gesammt. exper. Med. 43** — 58 — 1924).
42. BIERRY ET VIVARIO. — Dosage des albumines globales du plasma sanguin (**C. R. Soc. Biol. 2** — 13 — 1923).
— Etude comparative des protéines plasmatiques chez l'homme à l'état normal et pathologique (**id. 2** — 15 — 1923).
43. BIERRY, RATHERY et VIVARIO. — Carbone résiduel du plasma sanguin (**id. 2** — 18 — 1923).
43a BIRCHER M. E. et A. R. MAC FARLAND. — **Arch. of derm. a syph. 5** — 215 — 1922).
44. BOULANGER. — Méthode permanganimétrique de dosage des protides du serum sanguin (**Cptes rend. Soc. biol. 101** — 837 — 1929).
44a BOSSE P. — Untersuchungen über die Zusammensetzung des Blutserums und ihre Bedeutung für Giftwirkungen. III Mit. Die Wirkung von Äther auf Serum (**Pflüger's Arch. 210** — 56 — 1925).
45. BOYD G. L. — The value of colostrum to the newborn (**Can. med. assoc. journ. 12** — 724 — 1922).
46. BRIGGS R. S. — Studies in the blood relationship of animals displayed in the composition of the serum proteins IV. a comparison of the sera of the pigeon, rooster and guinea fowl with respect to their content of various proteins in the normal and in the fasting condition (**journ. Biol. Chem. 10** — 7 — 1915).
47. BROCQ-ROUSSEN, G. ROUSSEL, E. BERAUT. — Sur les sérums lactescents (**Cptes rend. Soc. Biol.** 16 nov. 1928).

48. BURCKHARDT A. E. — Beiträge zur Chemie und Physiologie des Blutserums (**Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 16** — 322 — 1882).

48a BYWATERS H. W. et G. S. TASKER Douglas. — On the real nature of the so called artificial globulin (**Journ. of Phys. 47** — 149 — 1913).

29. CARREL A. — Leucocytic trephones (**Journ. Amer. Med. Assoc. 82** — 255 — 1924).

50. CHERBULIEZ E. et G. de MAUDROT. — Sur un nouveau procédé de désagrégation des protides (**Cptes rend. de la soc. de phys. et d'hist. nat. de Genève**).

51. CHIK H. — Viscosity of some protein solutions II. Pseudoglobulin and euglobulin (horse) (**Biochem. Journ. 8** — 261 — 1914).

52. CHICK H. — The apparent formation of euglobulin from pseudoglobulin and a suggestion as to the relationship between these twe proteins in serum (**Biochem. journ. 8** — 404 — 1914).

53. CHICK H .et F. LUBRZYNSKA. — Viscosity of some protein solutions (**Biochem Journ. 18** — 59 — 1914).

54. COERZEE L. J. — The plasma proteins in normal and abnormal pregnancy (**Proc. roy. Soc. med. 18** — 28 — 1925).

55. COGGI C. — Les variations du taux des albumines et des globulines dans le plasma sanguin au cours de la grossesse (**Ann. di ostetr. e gynec. 52** — 8 — 1930).

56. COHN E. J. — The physical chemistry of proteins (**Physiol. Rewiews 5** — 349 — 1925).

57. CORIN G. et E. BERARD. — **Travaux du laboratoire de Leon Fredericq 2** — 170 — 1887).

58. CULLEN C. E. and D. D. VAN SLYKE. — Determination of the fibrin globulin and albumin nitrogen of blood plasma (**Journ. biol. Chem. 41** — 587 — 1920).

59. CUSHNY A. R. and J. A. GUNN. — The action of serum on the perfused heart of the rabbit. (**Journ. pharm. exper. ther. 5** — 1 — 1913).
60. CSATARY. — Über globulinurie (**Arch. f. klin. med. 48** — 358 — 1893).
61. DASTRE A. — **Compte rendus 120** — 859 — 1859).
62. DENIS P. S. — Mémoire sur le sang — **Paris 1859.**
63. DESEO DVON. — Refraktometrische Studien über das Serumeiweiss. II Mitt. Zur Eiweissbestimmungsmethode nach ROBERTSON (**Bioc. zsch. 217** — 197 — 1930).
64. DHERE CH. — Recherches spectrographiques sur l'absorption des rayons ultraviolets par les albuminoïdes, les protéines et leurs dérivés (**Thèse de Fribourg 1909**).
65. DOERR R. et W. BERGER. — Globulin und Albumin aus demselben Blutserum als immunisatorische Antagonisten (**Bioch. Zschr. 131** — 13 —
66. DOERR R. et W. BERGER. — Immunologische Analyse der komplexen Struktur des Serumeiweisses (**Zschr. Hyg. Infektionskr. 96** — 191 1922).
67. DŒRR R. et W. BERGER. — Über das Verhältnis der Fraktionspezifität zur Artspezifität bei den Eiweisskörpern der Blutsera (**id. 96** — 258 — 1922).
68. DUZAR J. et S. RUSZNYAK. — Die Bedeutung der Eiweissfraktionen des Blutplasma im Säuglingsalter (**Monatschr. Kinderheilh. 28** — 25 — 1924).
69. ELLINGER A. — Zustandsänderung der Serumkolloïde und ihre Bedeutung für den Wasserhaushalt (**Verhandl. Deutsch. Ges. inn. med. 32** — 273 — 1922).
69a EPSTEIN. — The nature and treatment of chronic parenchymatous nephrosis

Journ. of Exper. med. 16 — 719 — 1912
17 — 444 — 1913
20 — 334 — 1914
Journ. of americ. Assoc. 69 — 444 — 1917
Amer. journ. of med. sc. 163 — 1922
— Further observations on the treatment of chronic nephrosis (**id. 163** — 167 — 1922).

70. ERBEN. — Stud über Nephritis (**Zschr. f. klin. med. 57** — 39 — 1905).
71. ERBEN. — Die chem. Zusammensetzung des Blutes beim pernic. Anämie (**id. 40** — 266).
72. ETTRISCH G. et W. BECK. — Zur Frage der Fraktionierung der Serumproteine
I) die Elektrodialyse (**Bioc. Zschr. 171** — 443 — 1926).
II) zur Theorie der Elektrodialyse (**id.**).
III) die Säurefallung (**id. 172** — 1 — 1926).
73. FAHR G. F. et W. W. SWANSON. — The effective osmotic pressure of the plasma proteins (**Amer. journ. of physiol. 76** — 201 — 1926).
74. FAHRAEUS R. — The suspension stability of the blood (**Acta. med. scandin 55** — 1 — 1925).
75. FANCONI G. — Zur Frage des sogenannten künstlichen Globulins (**Bioch. Zschr. 39** — 321 — 1923).
76. FILINSKI. — Augmentation du taux de la globuline dans le sérum du sang comme résultat de l'insuffisance hépatique (**Presse méd.** mars 1922).

76a FISCHER. — Eléments modifiant l'équilibre colloïdal des sérums sanguins (**C. R. Soc. de Biol. 88** — 242 — 1923).
— Examen électro-colloïdal du sérum humain (**id.** 558).
— Electrophorèse du sérum chez le bœuf (**id.** 662).
— Electrophorèse de sérum et sens de migration du complexe globuline-albumine (**id.** 1251).

77. FOLIN O et W. DENIS. — Note on perca globulin (**Journ. of Biol. Ch. 21** — 193 — 1915).

78. FOLIN O. et J. M. LOONEY. — Colorimetric methods for the separate determination of thyrosin, tryptophan, and cystine in proteins (**Journ. of Biol. Chem. 51** — 421 — 1922).

79. FOLIN O. et H. WU. — A system of blood analysis (**id. 38** — 81 — 1919).

80. FOSTER D. P. — A clinical study of blood fibrin (**Arch. intern. med. 34** — 301 — 1924).

81. FOSTER D. P. et G. H. WHIPPLE. — Blood fibrin studies

I) An accurate method for the quantitative analysis of blood fibrin in small amounts of blood (**Amer. journ. phys. 68** — 365 — 1922).

II) Normal fibrin values an the influence of diet (**id. 68** — 379 — 1922).

III) Fibrin values influenced by transfusion, hemorrhage, plasma depletion and blood pressure changes (**id. 68** — 393 — 1922).

IV) Fbrin values influenced by cell injury, inflammation, intoxication, liver injury and the Eck fistule. Notes concerning the origin of fibrinogen in the body. (**id. 68** — 407 — 1922).

81a FRANKENTHAL K. — (**Zschr. f. Immünitätsf. und exp. Therap. 42** — 501 — 1925).

82. FREY W. — Beitrag zur Untersuchungen der Serumeiweisskörper (Methode der Serumgewinnung und Kritik der Roherschen Albumin-Globulinbestimmung (**Bioc. Zsch. 148** — 53 — 1924).

83. FREUND E. — Ueber chem. und physik. Verhältniss des Blutes bei Morbus Brighti (**Wien. klin. Rundsch. 1895**).

84. FREUND et JOACHIM. — Zur Kenntniss der Serumglobulin (**Zsch. f. Phys. chem., 36** — 407 — 1902).

85. FRIED E. — Eine mikromethode zur Bestimmung der Serumeiweisskörper (**Zschr. f. ges. exp. Med. 60** — 515 — 1928).

86. FULD E. — Ueber die Verbindungen von Eiweisskörpern mit Metaphosphorsäure (**Hofm. Beitr. 2** — 155 — 1902).

87. FULD et SPIRO. — Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes (**Zsch. phys. chem. 31** — 132 — 1900).

88. FURTH Von. — **Lehrbuch der Phys. und Pathol. Chemie — 2° édit.** 1925.

89. GALEHR O. — Die Serumeiweisskörper bei malignen Tumoren (**Wien. Arch. f. inn. Med. 60** — 379 — 1924).

90. GALEOTTI G. — Über die gleichgewichte zwischen Eiweisskörpern und Elektrolyten (**Zschr. f. ph. chem. 48** — 473 — 1906).

90a GARDNER et GAINSBOROUGH. — **Bioc. Journ. 21** — 130 — 1927.

91. GIBSON R. B. et E. J. BANZHAF. — The quantitative changes in the proteins in the blood plasma of horses in the course of immunization (**Journ. exp. Med. 12** — 411 — 1910).

92. GITHENS T. S. — Der Einfluss von Nahrungs- und Blutentziehung auf die Zusammensetzung des Blutplasmas (**Hofm. Beitr. 5** — 514 — 1904).

93. GLEY et PACHON. — Du rôle du Foie dans l'action anticoagulante de la peptone (**C. R. Ac. Sciences 121** — 383 — 1895).

94. GOODPASTURE E. W. — Fibrinogen — II The association of liver and intestine in rapid regeneration of fibrinogen (**Amer. journ. phys. 33** — 70 — 1914).

95. GORTER et F. GRENDEL. — Die Eiweissarbeitung als Methode zur Bestimung von Serumalbumin und Serumglobulin (**Bioc. zschr. 201** — 391 — 1928).

96. GOTTSCHAKT A. et W. NONNENBRUCH. — Untersuchungen über den intermediären Eiweisssstoffwechsel. (**Arch. exp. Path.u. Pharm. 99** — 261 — 270 — 300 — 1923).

97. GOVAERST P. et M. R. CORDIER. — Contribution à l'étude clinique et anatomique de la néphrose lipoïdique (**Bull. Ac. roy. de Médec. 8** — 510 — 1928).

98. GOVAERST P. — Influence du rapport albumine-globuline sur la pression osmotique des protéines du sérum (**C. R. Soc. Biol. 93** — 441 — 1925).

— Influence de la teneur en ions minéraux sur la pression osmotique des protéines (**id. 101** — 493 — 1929).

99. GOVAERST P. — Recherches cliniques sur la pression osmotique des colloïdes du sérum-Technique et résultats (**id. 89** — 678 — 680 — 1923).

100. GOVAERST P. — Description d'un osmomètre permettant l'étude clinique de la pression osmotique des protéines du sérum (**id. 90** — 969 — 1929).

101. GOVAERST P. — Etude clinique de la pression osmotique des protéines du sérum dans la pathogénie des œdèmes et de l'hypertension artérielle (**id. 91** — 116 — 1924).

102. GRABAR et WEILL. — Influence de la minéralisation sur la pression osmotique des albumines du sang «in vitro» (**C. R. Soc. Biol.** 868 sept. 1928).

103. GRAM H. C. — Un procédé nouveau pour le dosage de la fibrine dans le plasma et dans le sang (**C. R. Soc. Biol. 84** — 637 — 1929).

GRAM H. C. — A new method for the determination of the fibrin percentage in blood and plasma (**Journ. Biol. Chem. 49** — 297 — 1921).

GRAM H. C. — The results of a new method for determining the fibrin percentage in blood and plasma. (**Acta Med. Scandin. 56** — 107 — 1921).

104. GREENBERG DAVID M. — The colorimetric determination of the serum proteins (**Journ. of Biol. Chem. 82** — 545 — 1929).

105. GRIGAUT A., A. BOUTROUX et A. CODOUNIS. — Le dosage des proteines du sérum sanguin par précipitation alcoolique (**Bull. Soc. chim. biol. 12** — 20 — 1930).

106. GUILLAUMIN, R. WAHL et Mlle LAURENCIN. — Sur le dosage des albumines sériques. Comparaison de quelques résultats obtenus par pesée par azotométrie et par réfractométrie. (**Bul. Soc. Chim.Biol. 11** — 387 — 1929).

107. GUTZEIT K. — Ueber die Methodik von Albumin-Globulinbestimmungen und ihre Zuverlässigkeit mit bes. Berücksichtigung der Mikromethodik. Zugleich ein Beitrag zur Frage der Umwandlung von Albumin in Globulin (**Zschr. gesammt. exp. med. 39** — 397 — 1924).

108. GUTZEIT K. — Ueber die Verteilung der Albumine und Globuline im tierischen Organismus (**Deutsch. Arch. f. klin. Med. 143** — 238 — 1923).

109. HAFNER E. A. — Zur Nomenklatur der Serumeiweisskörper und der verschiedenen Serumviskositäten (**Bioc. Zsch. 165** — 29 — 1925).

110. HAFNER E. A. — Ueber die spezifische Rotationsdispersoin der Serumeiweissfraktionen (**id. 166** 424 — 1925).

111. HAFNER E. A. — Über den Globulin- und Albuminkoeffizienten des Serums besonders während

der Schwangerschaft (**Arch. exp. Path. und Pharm. 101** — 335 — 1924).

112. HAFNER E. A. — Ueber Viscosität und Kolloïdzustand (**Klin. wochschr. 4** — 197 et 802 — 1925).

112a HAFNER et KURTHY. — **Arch. f. exp. Path. und Pharm. 104** — 148 — 1924.

113. HALLIBURTON W. D. — The proteids of serum (**Journ. Phys. 55.** — 152 — 1885).

114. HAMMARSTEN O. — **Lehrbuch der physiologischen Chemie.** (Munich 1922).

115. HAMMARSTEN O. — Ueber das Paraglobulin (**Arch. d. Ges. Phys. 17** — 413 — 1878.
Über das Fibrinogen (**id. 22** — 431 — 1886).

116. HAMMARSTEN O. — Ueber die Anwendbarkeit des Magnesiumsulfates zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Globulin (**Zschr. f. Phys. Chem. 8** — 467 — 1883-84).

117. HAMMARSTEN O. — Ueber die Eiweissstoffe des Blutserums (**Erg. d. Phys. I. Arb.** — 330 — 1903).

118. HANDOVSKY H. et R. WAGNER. — Ueber einige physikalisch-chemische Eigenschaften von Lecithinemulsion und Lecithineiweissmischungen (**Bioc. Zschr. 26** — 32 — 1911).

119. HANDOVSKY H. — Unterschungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloïde — X Mitt. — Die Eiwirkung von organischen Basen und amphoteren Electrolyten auf Eiweiss. (**Bioc. Zschr. 25** — 510 — 1910).

120. HANDOVSKY H. — Ueber die Kolloïde Struktur der Blutflüssigkeit, besonders über die Bedeutung des Cholesterins. (**Münch. med. Woch. 71** — 708 — 1924).

120a HANDOVSKY. — Untersuchungen über die zusam-

mensetzung des Blutserums und ihre Bedeutung für Giftwirkungen-I Mitteilung — Einleitung (**Pflüger's Arch. 210** — 35 — 1925).

HANDOVSKY H. et P. BOSSE. — Untersuchungen über die Zusammensetzung des Blutserums und ihre Bedeutung für Giftwirkungen.

II Mit. — Charakterisierung der Eiweissfraktionen des normalen Serums durch die Viscosität (**id. 210** — 50 — 1925).

HANDOVSKY H. et K. LOHMANN. — Untersuchungen über die Zusammensetzung des Blutserums und ihre Bedeutung für Giftwirkungen — IV Mit. Methode zur Bestimmung des Cholesterins in Blutserum (**id. 210** — 59 — 1925).

121. HANDOVSKY H., K. LOHMANN et P. BOSSE. — Untersuchungen über den Zustand des Cholesterins im Blutserum. V. Mit: Untersuchungen über den Zustand des Cholesterins im Blutserum. (**Pflüger's Arch. 210** — 63 — 1925).

122. HARDY W. B. — Colloïdal solution. The Globulins. (**Journ. of Phys. 33** — 251 — 1905).

123. HARTL K. et W. STARLINGER. — Ueber das physikochemische Verhalten der Electrodialytisch gereinigten und in Natriumsalsform gelösten Eiweisskörpergruppen pathologischen menschlischen Blut- und Exsudatplasmen (**Zschr. f. ges. exp. Med. 60** — 189 et 315 1928).

124. HARTLEY P. — The determination of the composition of the different proteins of ox and horse serum by the method of Van Slyke. (**Bioc. Journ. 8** — 541 — 1914).

125. HANSON S. — The constancy of the protein quotient during intensive digestion and prolonged starvation (**Journ. Immunol. 3** — 67 — 1918).

126. HANSON S. et I. McQUARRIE. — The non dependance of protein quotient in the blood serum

upon the rajidity of metabolism with especial reference to the non effect of antipyrectis, sodium cacodylates and thyroid extract (**Journ. pharm. and ther. 10** — 261 — 1918).

127. HASHIMOTO M. — Ueber die Zusammensetzung von serumeiweiss bei Syphilis nebenbei über die Mikrobestimmungsmethode von Serumglobulin. (**Jap. J. of Derm.** N° **12** P. 1252).

127. HASLAM H. C. — Pseudoglobulin — (**Journ. of Phys. 44** — 1912).

128. HASLAM H. C. — The separation of proteids (**Journ. of Phys. 32** — 267 — 1905).

129. HENLEY R. R. — The determination of globulins in blood serum. (**Journ. Biol. Chem. 52** — 367 — 1922).

130. HEIDELBERGER M. et L. LANDSTEINER. — On the antigenic properties of hemoglobin (**Journ. exp. Med. 38** — 561 — 1923).

131. HEKTOEN L. et W. H. WELKER. — Precipitin reactions of serum proteins. (**Journ. inf. diseases 35** — 295 — 1924).

132. HERZFELD E. et R. KLINGER. — Studien zur Chemie der Eiweisskörper:

I) Die Eiweissfraktionen des Blutplasmas. (**Bioc. Zsch. 83** — 228 — 1917).

II) Ueber den artspecifischen Bau des Eiweisskörper. (**id. 99** — 204 — 1919).

133. HERZFELD E. et R. KLINGER. — Neuere Eiweisschemische Vorstellungen in Ihren Beziehungen zur Immunitätslehre. (**Erg. Hyg., Bakt., Immunitätsf. exp. Ther. 4** — 282 — 1920).

134. HERZFELD E. et R. KLINGER. — Beiträge zur Chemie der Eiweisskörper. (**Bioc Zsch. 102** — 89 — 1920).

134a HEYNSIUS A. — **Pflüg. Arch. 34** — 330 — 1884.

135. HOFMEISTER FR. — Zur Lehre von der Wirkung der

Salze. (**Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 24** — 247 — 1888).

136. HOLM SIGRID ET HELGI TOMASSON. — Eine Methode zur Proteinbestimmung in 0,I ccm., serum. (**Bioc. Zschr. 159** — 472 — 1925).

137. HOWE P. E. — The differential extraction and precipitation of the soluble proteins of muscle, with data on the concentration of proteins in the muscle of the calf, cow and rabbit (**Journ. biol. chem. 61** — 493 — 1924).

138. HOWE P. E. — The fonction of the plasma proteins. (**Physiol. Reviews 5** — 339 — 1925).

139. HOWE P. E. — The relation between the ingestion of colostrum or blood serum and the apearance of globulin and albumin in the blood of the newborn calf. (**Journ. exp. med. 39** — 313 — 1924).

140. HOWE P. E. — The relative precipitating capacity of certain salts when applied to blood serum or plasma and the influence of the cation in the precipitation of proteins. (**Journ. biol. chem. 57** — 241 — 1923).

141. HOWE P. E. — The differential precipitation of the proteins of colostrum (**id. 52** — 51 — 1922).

142. HOWE P. E. — The relation between age an the concentrations of protein fractions in the blood of the calf and cow. (**id. 53** — 479 — 1922).

143. HOWE P. E. — The determination of fibrinogen by precipitation with sodium sulfate compared with the precipitation of fibrin by the addition of calcium chloride. (**id. 57** — 235 — 1923).

144. HOWE P. E. — The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. (**id. 49** — 93 — 1921).

145. HOWE P. H. — The determination of proteins in blood a micromethod. (**id. 49** — 109 — 1921).

146. HOWE P. E. — An effect of the ingestion of colostrum upon the composition of the blood of new-born calves. (**id. 49** — 115 — 1921).

147. HOWE P. E. et E. S. SANDERSON. — Variations in the concentration of the globulin and albumin fractions of the blood plasma of young calves and a cow following the injection of bacillus abortus. Variations in the concentration of the protein fractions of the blood plasma of pregnant and non pregnant cows or of cows which have aborted. (**Journ. biol. chem. 62** — 767 — 1924).

148. HOWELL. — The proteids of the blood with especial reference to the existence of the existence of a non coagulable. (**Amer. Journ. of phys. 17** — 280 — 1906).

149. HUECK Herm. — Zur Untersuchung der Eiweisskörper des Blutes. (**Bioc. Zschr. 159** — 89 — 1925).

150. HUECK et WACKER. — Ueber die Beziehungen des Cholesterins zum intermediären Fettstoffwechsel. (**Bioc. Zschr. 100** — 84 — 1919).

151. HUISKAMP W. — Ueber die Fällung des Serumglobulins im Blutserum mittels Essigsäure. (**Zschr. f. phys. chem. 46** — 394 — 1905).

152. INAGAKI. — Die Veränderungen des Blutes nach Blutverlusten. (**Zschr. f. Biol. 49** — 77 — 1907).

153. INOUYE I. — Über die Beeinflussung der Serumeiweissverteilung durch Cholesterin (**Verhandl. d. Japan. ges. f. Inn. Med.** — **40** — 1926).

154. JARISCH A. — Beiträge zur Pharmakologie der Lipoïde — II Mitt. (**Pflüger's Arch.** — **194** — 337 — 1922).

155. JEWETT R. M. — Studies in the blood relationship of animals as displayed in the compositions

of the serum proteins (**Journ. Biol. Chem. 23** — 21 — 1916).

156. JOACHIM J. — Über die Eiweissverteilung in menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten (**Arch. f. Ges. Ph. 93** — 558 — 1902).

157. JONES F. S. — The liver as a source of agglutinin (**Journ. Med. Research 41** — 767 — 1925).

158. KAPSENBERG G. — Die Bedeutung des Globulins und des Albumins bei den Syphilisreaktionen und anderen Immunitätsreaktionen und die Globulin-Albuminfrage (**Zschr. Immunitätsf. u. exp. Ther. 42** — 284 — 1925).

159. KAYSER F. — Dosage rapide des protéines du sérum sanguin (**C. R. Soc. Biol. 12** — 533 — 1930).

160. KERR J., S. H. HURWITZ et G. H. WHIPPLE. — Regeneration of blood serum proteins
I) Influence of fasting upon the curve of protein regeneration following plasma depletion (**Amer. journ. phys. 47** — 356 — 1918).
II) Influence of diet upon curve of protein regeneration following plasma depletion (**id. 47** — 370 — 1918).
III) Liver injury alone: liver injury and plasma depletion: the Eck fistula combined with plasma depletion (**id. 47** — 379 — 1918).

161. KIAMIL, SERVER, RASSIM ALI. — Action de la chaleur sur les matières protéiques du sérum sanguin (**C. R. Soc. Biol. 98** — 419 — 1928).

161a KIMURA R. — **Zschr. f. Immunitätsf. 56** — 330 — 1928).

162. KOCH F. C. et T. L. Mc MEEKIN. — A new direct nesslerization micro-kjeldahl method and a modification of the Nessler-Folin reaction for ammonia (**Journ. Amer. chem. Soc. 46** — 2066 — 1924).

163. KRŒTZ C. — Zur Biochemie der Strahlenwirkungen (**Bioc. Zschr. 151** — 449 — 1924).

164. KURTEN H. — Über den Globulin- und Albuminkoeffizienten des Serums, besonders während der Schwangerschaft (**Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 103** — 237 — 1924).

164a KUHNE W. — **Lehrb. d. phys. chem.** Leipzig 1866.

165. LANG K. — Über die Möglichkeit eines individuellen chemischen Aufbauer der Bluteiweisskörper (**Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 148** — 222 — 1930).

166. LEDERER M. — Paralleluntersuchungen über Serumeiweissgehalt, Senkungsgeschwindigkeit und Lipasegehalt des Blutes gesunder Kinder (**Monatsschr. f. Kinderheilk. 27** — 608 — 1924).

167. LEENDERTZ G. — Beitrag zur Untersuchungen der Serumeiweisskärper (**Bioc. Zschr. 150** — 494 — 1924).

167a LEWINSKI J. — Beobachtungen über den Gehalt des Blutplasmas an Serumalbumin, Serumglobulin und Fibrinogen (**Pflüg. Arch. 100** — 611 — 1903)

168. LEWIS S. J. — Ultraviolet absorption Spectra and optical rotation of the proteins of blood sera (**Proc. Roy. soc. London 93** — 178 — 1922).

169. LEWIS J. H. et H. G. WELLS. — Function of colostrum (**Journ. Amer. Med. Assoc. 78** — 863 — 1922).

170. LEWITH S. — Zur Lehre von der Wirkung der Salze (**Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 24** — 1 — 1888).

171. LIMBECK Von et PICK. — Über die quantitativen Verhältnisse der Eiweisskörper im Blutserum von Kranken (**Prag. med. Woch. 12** — 1893).

172. LINDER G. C., LINDSGAARD et D. D. Van SLYKE. — The concentration of the plasma proteins in

nephritis (**Journ. exp. Med. 39** — 887 — 1924)

173. LŒB J. — Proteins and the theory of colloïdal behawar — **New-York 1922**).

174. LŒPER M. et TONNET. — L'accroissement paradoxal des albumines du sérum de certains cancéreux (**C. R. Soc. Biol.** juill. 1920).

175. LŒPER M. et TONNET. — L'hyperalbuminose du sérum des cancéreux est due à la globuline (**id.** juill. 1920).

176. LŒPER M., J. FORESTIER et J. TONNET. — La parenté des albumines, des tumeurs et du sérum des cancéreux prouvée par l'anaphylaxie (**id.** juill. 1920).

177. LŒPER M., J. FORESTIER et J. TONNET. — L'hyperalbuminose paradoxale du sang des cancéreux (**Presse méd.** 333 — 1921).

178. LŒPER M., RAVIER J. de SEZE et Mlle LEBERT. — La globulinémie à la période critique de la pneumonie (**C. R. Soc. Biol.** juin 1929).

179. LOEPER M., J. TONNET et Mlle LEBERT. — L'augmentation relative de la sérine du sang dans l'hyperthyroïdisme (**id.** juin 1929).

180. LŒW O. — Eiweissprobleme (**Chem. Ztg. 68** — 418 — 1920).

181. MACHEBŒUF M. A. — Recherches sur les phosphoaminolipides et les stérides du sérum et du plasma sanguins.

I) Entraînement des phospholipides, des stérols, et des stérides par les diverses fractions au cours du fractionnement des protides du sérum (**Bull. Soc. Chim. biol. 2** — 268 — 1929).

II) Etude physico-chimique de la fraction protéidique la plus riche en phospholipides et en stérides (**id. 2** — 485 — 1929).

182. MACHEBŒUF M .A. — Recherches sur le rôle des

lipides et des protides sanguins dans les échanges d'eau de l'organisme (**C. R. AC. des Sc. 192** — 1413 — 1931).

182a MACHEBŒUF M. A. et R. WAHL. — Recherches biochimiques sur les sérums des malades atteints de néphrose lipoïdique (**id. 192** — 1059 — 1931).

MACHEBŒUF A. et R. WAHL. — Recherches biologiques sur la néphrose lipoïdique. I. Etude des globulines et des albumines du sérum sanguin et des lipides qui les accompagnent dans leur précipitation (**Bul. Soc. Chim. Biol. 13** — 486 — 1931).

III. Fractionnement des albumines du sérum sanguin et des lipides qui les accompagnent (**id. 511**).

MACHEBŒUF A., R. WAHL et G. SANDOR. — II. Etude qualitative des lipides et des diverses fractions lipidiques du sérum sanguin (**id. 504**).

183. MATHEWS A. P. — Physiological chemistry (**New-York 1923**).

184. MATSUMARA S. — Über die Reaktion der Proteins mit Seifen und Fettsäuren (**Kolloïd. Zschr. 32** — 173 — 1923).

185. MARRIOTT W. McK. — Anhydremia (**Phys. Reviews 3** — 275 — 1923).

185a MAYER A. et G. SCHÆFFER. — Teneur en lipides des globules et du sérum sanguin. (**Journ. de phys. et de path. gén. 15** — 1913).

186. Mc LESTER J. S., M. T. DAVIDSON et B. FRAZER. — Blood fibrin changes in various diseases with special reference to disease of the liver (**Arch. int. med. 35** — 177 — 1952).

186a MELLANBY J. — The precipitation of the proteins of horse serum (**Journ. of phys. 36** — 288 — 1908).

187. MENAUL P. — A note on a modification of the Van Slyke method of proteins analysis (**Journ. of biol. chem. 46** — 351 — 1921).

187a MERKLEN Pr., Mlle LEBRETON et R. CAHN. — Sur un cas de néphrose lipoïdique (**Bull. Soc. méd. hop.** — 259 — 1929).

188. MIRANDE F. M. — Etude expérimentale de la pathologie des néphroses lipoïdiques (**Arch. d. med. Cir. y Especialdades 33** — 8 — 1930).

189. MOLL L. — Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin (**Hofm. Beitr. 4** — 563 — 1904).

190. MORAWITZ P. — Blutplasma und Blutserum (**Oppenheimer's Handb. d. Bioch. 4** — 78 — 1923).

191. MŒRNER C. TH. — Perca globulin, ein charakteristischer Eiweisskörper aus dem Ovarium des Barsches (**Zschr. f. Ph. Chem. 40** — 429 — 1903).

— Prüfung des Rogens von Meerbarsch bezüglich des Vorkommens von Percaglobulin (**id. 58** — 452 — 1909).

— Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen (**id. 34** — 207 — 1901).

192. MUSA G. — Über die Sekungsreaktion der roten Blutkörperchen und ihre Ursachen (**Klin. Woch. 2** — 1591 — 1923).

193. MYERS V. C. — Chemical changes in the blood and their clinical significance (**Phys. Reviews 4** — 274 — 1924).

194. NEUSCHOSZ S. M. — Über den kolloïdalen Zustand des Cholesterins im Blutserum — III) Beziehung zwischen Cholesterin und Blutprotein (**Rev. soc. arg. Biol. 4** — 718 — 1928).

195. NÆGLI O. — Blutkrankheiten und Blutdiagnostic (**Leipzig 1923**).

196. NOGUCHI H. — Test for changes in the protein content of the cerebrospinal fluid, based on the flocculation of lipoïds (**Journ. of the Amer. Ass. 10** — 632 — 1921).

197. OBERMAYER F. et R. WILHELM. — Formoltitrieruntersuch an Eiweisskörper (**Bioc. Zschr. 38** — 331 — 1912 et **50** — 369 — 1913).

198. ŒHME C. — Der Wasser-Salzbestand des Körpers in Beziehung zum Säure-Basenhaushalt (**Arch. exp. Path. Pharm. 102** — 40 — 1924).

199. OPPENHEIMER C. — Über Fractionierung der Serumalbumin (**Arch. f. Phys. 201** — 1903).

200. ORCUTT M. L. et P. E. HOWE. — The relation between the accumulation of globulins and the apparence of agglutinins in the blood of newborn calves (**Journ. exp. Med. 36** — 291 — — 1922).

201. OSBORNE T. B. — Ein hydrolytisches Derivat des Globulins Edestin und sein Verhältnis zu Weyl's Albuminat und zu Histongruppe (**Zschr. f. phys. Chem. 33** — 225 — 1901).

— Der basische Character des Proteinsmolekuls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen von Säuren und Alkali (**id. 33** — 240 — 1901).

202. OSBORNE T .B. et L. M. LIDDLE. — Note on the analysis of Edestin and rein (**Am. journ. of phys. 26** — 295 — 1910).

203. OSBORNE T. B .et I. F. HARRIS. — The precipitation limits with ammonium sulfate of source vegetable proteins (**Am. journ. of phys. 13** — 436 — 1905).

204. OSWALD AD. — Die Eiweisskörper der Schildrüse (**Zschr. f. phys. chem. 27** — 14 — 1899).

205. OSWALD AD. — Zur Kenntniss des Thyreoglobulins (**id. 32** — 121 — 1901).

206. PANUM. — **Virch. Arch. 3** — 251 — 1851 et **4** — 419 — 1851.

207. PATEIN G. — Etude comparative des globulines qui se précipitent dans le sérum et le plasma sanguin neutralisés par l'acide acétique (**C. R. Soc. Biol. 63** — 53 — 1907).

208. PAULI W. — Die neue Entwicklung der Kolloïdchemie und Medizin (**Klin. Woch. 3** — 1 — 1928).

209. PAULI W. — Untersuchungen an elektrolytfreien Wasserläslichen Proteinen
I Mitt.: Die Elektrodialyse (**id. 152** — 355 — 1924).
VII Mitt.: Hydratation und Ladungsvorzeichen der Proteinionen (**Bioc. Zschr. 202** — 337 — 1928).

210. PAULI W. — Die physikalischen Zustandsänderungen der Eiweisskörper (**Arch. f. ges. Phys. 78** — 315 — 1899).

211. PAULI W. et L. FLECKER. — Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloïde — XIII: die Beziehungen von Eiweiss zu anorganischen Kolloïden und Schwermetallsalzen (**Bioc. Zschr. 41** — 461 — 1912).

212. PETSCHACHER L. — Veränderungen des Kolloïdzustandes der Serumeiweisskärper unter physikalischen Einflüssen (**Zschr. f. exp. Med. 47** — 348 — 1925).

213. PETSCHACHER L. — Über die Veränderungen der Eiweisskörper und der Viscosität des Blutserums bei pulmonalen Dyspnoe (**Wien. Arch. f. inn. Med. 8** — 369 — 1924).

214. PETSCHACHER L. — Über die spezifische Viscositätserhöhung der Serumeiweisskörper (**Zschr. f. ges. exp. Med. 41** — 142 — 1924).

215. PETSCHACHER L. — Die spezifische Viscositätserhöhung der Serumeiweisskörper (**id. 50** — 473 — 1926).

216. PETSCHACHER L. — Spezifische Viscositätserhähung und Kolloïdzustand der Serumeiweisskörper (**id. 47** — 325 — 1925).

217. PETSCHACHER L. et H. HONLINGER. — Über die Veränderungen der Eiweisskörper und der Viscosität des Blutserums bei Nierenerkrankungen (**Wien. Arch. f. inn. Med. 9** — 351 — 1924).

218. PETSCHACHER L., W. BERGER et G. SCHRETTER. — Vergleichende Untersuchungen zur microeiweisskörperanalyse des Blutserums (**Zschr. f. ges. exp. Med. 50** — 449 — 1926).

219. PETERS J. P., A. J. EISENMANN et H. A. BULGER. —The plasma proteins in relation to blood hydration (**Journ. clin. inv. I** — 435 — 1925).

220. PETERSON W. F., S. A. LEVINSON et AL. — Studies in endothelial permeability (**Journ. Immun. 8** — 323 — 1923).

221. PICK P. E. — Untersuchungen über die Proteinstoffe (**Zsch. f. phys. Chem. 24** — 246 — 1898).

— Zur Kenntnis der Immunkörper I; Versuche zur Isolierung von Immunkörpern des Blutserums (**Hofm. Beitr. 1** — 351 — 1901).

222. PINKUS S. N. — On the precipitation of proteins with anhydrous sulphate of sodium (**Journ. of phys. 27** — 57 — 1901/1902).

223. PHILIPSON L. — La teoria del Baleotti sulle globuline applicata agli sulle del sangue (**Rive di patol. sper. 2** — 60 — 1927).

224. PIETTRE M. — Sur quelques propriétés chimiques et physiques des protéines du sérum (**C. R. Ac. des Sc. 186** — 1657 — 1928).

225. PIETTRE M. — Sur quelques propriétés de la sérumalbumine: sa cristallisation en l'absence de tout

élément ionogénique (**C. R. Acad. Sc. 188** — 463 — 1929).

226. PIETTRE M. — Influence des sels neutres sur la séparation des protéines par la méthode à l'acétone (**id. 189** — 1034 — 1929).

227. PIETTRE M. et A. VILLA. — Sur quelques propriétés de la sérine (**C. R. Ac. des Sc. 171** — 371 — 1920).

— Sur la préparation des protéines du sérum (**id. 170** — 1466 — 1920).

— Séparation des protéines du sérum (**Bul. Soc. Biol. 483** — 3 — 1921).

228. PLASS E. D. et L. J. BOGERT. — Plasma protein as an index of hydroplasmia during pregnancy (**Journ. biol. chem. 59** — 24 — 1924).

229. PLIMMER R. H. A. — The chemical and biological differnces in proteins (**Scientia 30** — N° 9 — 195 — 1921).

230. POHL J. — Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten (**Arch. f. exp. Path. u. pharm. 20** — 426 — 1886).

231. POHLMANN J. — Die Chimie der Eiweisskörper und die physiologische Synthese der Polypeptide (**Inaug. Diss. Delf. 166** — 1920).

232. PORGES O. et K. SPIRO. — Die Globuline des Blutserums (**Hofm. Beitr. 3** — 276 — 1903).

233. PROCA. — Sur la séparation des globulines du sérum par l'alcool à basse température (**C. R. Soc. Biol. 90** — 721 — 1924).

233a QUINAN C. — Über spezifische Erythrolyse (**Hofm. Beitr. 5** — 95 — 1904).

— On the quatitative separation of the globulins of hemolytic serum with special reference to the carbon dioxyde group. (**Univ. of Calif. Publications pathol.** vol. I N° 1).

234. RANDOIN (Mme LUCIE) et Mlle A. MICHAUX. — Variations de la teneur du sérum sanguin en globuline et en sérine sous l'influence d'un régime déséquilibré par absence complète de vitamines antiscorbutiques (**C. R. Ac. SC. 192** — 1276 — 1931).

235. RANDOIN (Mme LUCIE) et Mlle A. MICHAUX. — (**id. 188** — 729 — 1929).

236. REISSS E. — Refraktometrische Blutuntersuchungen (**Abderhalden Handb. d. biol. Arbeitsmet. 4** — 299 — 1923).

237. REISS E. — Untersuchungen der Blutkonzentration des Säuglings (**Jahrb. f. Kinderheilk. 70** — 311 — 1909).

283. — Die refraktometrische Blutuntersuchung und ihre Ergebnisse für die Physiologie und Pathologie des Menschen (**Erg. d. inn. Med. und Kinderheilk. 10** — 531 — 1913).

239. REYE. — Über Nachwer und Bestimmung des Fibrinogen — **Thèse de Strasbourg 1898.**

239a REYMANN G. C. — Untersuchungen über die Eiweissfraktionen im Serum Diphtérie immunisierte Pferde, nebst anderen die Immunisierung betreffenden Verhältnissen (**Zschr. f. Immunitätsf. 39** — 15 — 1924).

240. ROBERTSON Br. T. — Concerning the relative magnitude of the parts played by the proteins and by the Bi-carbonates in the maintenance of the neutrality of the blood (**Journ. of biol. chem. 7** — 351 — 1909/10).

241. ROBERTSON Br. T. — Note on the applicability of the laws of amphoteric electrolytes to serum globulin (**id. 5** — 155 — 1908/09).

242. ROBERTSON Br. T. — On the refractive indices of solutions of certain proteins (**id. 7** — 359 — 1909/10).

243. ROBERTSON Br. T. — On the refractive indices of solutions of certain proteins VI — A new optical method of determining the concentration of the various proteins contained in blood-sera (**id. 2** — 3 — 1912).

244. ROBERTSON Br. T. — A micro-refractometric Method of determining the percentage of globulin and albumin in very small quantities of blood serum (**id. 22** — 1 — 1915).

244a RODRIGUEZ CARRACITO. — **Revista ihero americ. d. ciencias med. 7** — 87 — Madrid.

245. ROHRER F. — Refraktometrische und viscometrische Untersuchungen am Blutserum (**Schweitz. med. Woch. 52** — 555 — 1922).

246. ROHRER F. — Bestimmung des Mischungsverhältnisses von Albumin und Globulin im Blutserum (**Deutsch. Arch. klin. Med. 121** — 221 — 1916).

247. RONA et H. KLEINMANN. — Eine Methode zur nephelometrischen Bestimmung kleinster Eiweissmengen (**Bioc. Zschr. 140** — 461 — 1923).

248. RONA et H. KLEINMANN. — Nephelometrische Untersuchungen über fermentative Eiweissspaltung (**id. 140** — 478 — 1923).

249. RONA et A. KREBS. — Physikalisch-chemische Untersuchungen über die Isohämagglutination-I mitt. (**id. 169** — 267 — 1926).

250 RONA P. et L. MICHAELIS. — Beiträge zur allgemeinen Eiweisschemie — II Mitt. über die Fällung der Globuline im isoelektrischen Punkt (**id. 28** — 193 — 1910).

251. ROUS P. — Destruction of the blood corpuscles in health and disease (**Phys. Reviews 3** — 75 — 1923).

252. RUPPEL W. G., O. ORNSTEIN, J. CARL et G. LASCH. — Lyophile und lyophobe Eiweisskörper als Antigen und Antikörper (**Zsch. Hyg. Infektionskrankh. 97** — 188 — 1922).

253. RUSZNYAK S. — Physikalisch-chemische Untersuchungen an ûörperflüssigkeiten — VII Mitt. — Die Umwandlung von Albumin in Globulin (**Bioc. Zschr. 140** — 179 — 1923).

254. RUSZNYAK S. — Die nephelometrische Bestimmung des Albumin-Globulinquotient (**id. 133** — 370 — 1922).

255. RUSZNYAK S. — Physikalisch-chemische Untersuchungen an Körperflüssigkeiten (**id. 133** — 359 — 1922).

256. RUSZNIAK S. — Die Umgestaltung des Chromophotometers von Plesh in ein Nephelometer (**id. 133** — 365 — 1922).

257. RUSZNYAK et ERDES. — Die Bestimmung der Eiweissfraktionen des Blutes mit der gravimetrischen und nephelometrischen Methode (**id. 206** — 482 — 1929).

258. ROWE A. H. — The albumin and globulin content of human blood serum in healt, syphilis, pneumonia, and certain other infections with the bearing of globulin on the Wassermann reaction (**Arch. Int. Med. 18** — 455 — 1916).

259. ROWE A. H. — Refractomatric studies of serum proteins in nephritis, cardiac decompensation, diabetes, anemia and other chronic diseases (**id. 19** — 354 — 1917).

260. SABIN F. R. — Studies on the origin of blood vessels and of the red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation (**Carnegie Inst. Washington-Contributions to embryology 9** — 272 — 1920).

261. SCHADE H. et H. MENSCHEL. — Über die Gesetze der Gewebsquellung und ihre Bedeutung für klinische Fragen (**Zschr. f. klin. Med. 96** — 279 — 1923).

262. SCHIFF Er. et E. ROSER. — Über das quantitative Verhalten der Albumin und Globuline im Blutserum des Säuglings (**Monatschr. f. Kinderheilk. 19** — 15 — 1920).

263. SCHMIDT A. — **Arch. f. Anat. u. Phys. 408** — 1862. — Über die Faserstoffgerinnung (**Arch. f. ges. Phys. 5** — 481 — 1872).

264. SCHMIDT A. — Neue Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung (**id. 6** — 413 — 1872).

265. SCHMIDT A. — Über die Beziehung der Faserstoffgerinnung zu den körperlichen Elementen des Blutes (**id. 2** — 291 — 1875).

266. SCHMIDT A. — Bemerkungen zu Olof HAMMARSTEN's Abhandlung: Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung (**id. 13** — 146 — 1876).

267. SCHNEIDER F. — Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung des Eiweisskörpers im Blutserum (**Bioc. Zschr. 211** — 207 — 1929).

268. SCHRETTER G. — Der spezifische Brechungszuwachs des gesamt Eiweiss von Serumalbumin und Serumglobuline (**id. 177** — 349 — 1926).

269. SCHULTZ E. W., J. K. NICHOLES et J. H. SCHÆFER. — Studies on blood fibrin, its quantitative determination; normal fibrin values, and factors which influence the quantity of blood fibrin (**Amer. journ. Path. 1** — 101 — 1925).

269a SIKES A. W. — On the globulin of «albuminous» urine (**Journ. of Phys. 33** — 101 — 1905).

270. SMITH H. P., A. E. BELT et G. H. WHIPPLE. — Rapid blood protein depletion and the curve

of regeneration (**Amer. journ. Phys. 52** — 54 — 1920).

271. SÖRENSEN S. P. L. — The solubility of proteins (**Journ. amer. chem .soc. 47** — 467 — 1925).

271a SÖRENSEN S. P. L. — **Cptes Rend. du labor. de Carlsberg 18e vol.** pages 1 à 124 — 1930.

272. SÖRENSEN S. P. L. et M. HOYRUP. — Studies on Proteins (**C. R. lab. de Carlsberg 12** — 213 et 467 — 1917).

273. SPIEGEL-ADOLF M. — Die Globuline — 1930.

274. SPIEGEL-ADOLF M. — Neue Beiträge zur Frage der Eiweissdenaturierung (**Bioc. Zschr. 204** — 1 — 1928).

275. SPIEGEL-ADOLF M. — Hitzeveränderungen des Albumins (**id. 170** — 126 — 1926).

276. SPIEGEL-ADOLF M. — Goldsol und Proteine (**id. 180** — 395 — 1927).

277. SPIEGEL-ADOLF M. — Physikalisch-chemische Untersuchungen bestrahlter Proteine I. Mitt. — IV. Mitt. (**Bioc. Zschr. 186** — 181 1927 et **197** — 197 — 1928).

278. SPIEGEL-ADOLF M. et A. FERNAU — V. Mitt. (**id. 204** — 14 — 1928).

279. SPIEGEL-ADOLF et O. KRUMPEL — VII. Mitt. (**id. 208** — 45 — 1929). II. Mitt. (**id. 213** — 475 — 1929).

280. SPIRO P. — Klinische Untersuchungen zur spezifischen Viscosität des Blutserums (**Arch. exp. Path. u. Pharm. 100** — 38 — 1923).

281. SPIRO K. — Die Fällung von Kolloïden (**Beitr. chem. Phys. u. Path. 4** — 300 — 1903).

282. SPIRO K. — Über Nachweiss und Vorkommen des Glycocolls (**Zschr. f. phys. Chem. 28** — 174 — 1899).

283. STARKE J. — Globulin als Alkali. Eiweissverbindung (**Zschr. f. Biol. 40** — 419 — 1900).

284. STARKE J. — Über Transformation von Albumin in Globulin (**id. 40** — 494 — 1900).

285. STARLINGER F. — Physikalisch-chemische Untersuchungen zum Schildrusenproblem (**Mitt. grenz. Med. Chir. 36** — 334 — 1923).

286. STARLINGER R. — Über das Flockungsvermögen des menschlichen Blutplasmas (**Bioc. Zschr. 123** — 215 — 1921).

287. STARLINGER. — Über die Methodik des quantitativen Bestimmung des Fibrinogen (**id. 140** — 203 — 1923).

288. STARLINGER. — Über das Verteilungsverhältnis der Eiweisskörpergruppe in tertiärsyphilitischen Seren bei positiver Komplementbindungsreaction (**id. 169** — 449 — 1926).

289. STARLINGER et HARTL. — Über die Methodik der quantitativen Bestimmung der Eiweisskörpergruppen des menschlichen Blutserums (**id. 160** — 113, 129, 147 — 1925).

290. STARLINGER et WINANDS E. — Über das Verteilungsverhältnis der zirkulierenden Eiweisskörper im Verlaufe krankhafter Zustände (**Zschr. f. d. ges. exp. Med. 60,** 138, 208 — 1928).

291. STARLINGER W., K. SPATH et E. WINANDS. — Fortgeführte Untersuchungen über Massanalyse, Aussalzarbeit und spezifische Refraktion der Eiweisskörpergruppen des menschlichen Blutplasmas, nebst Bemerkungen über die Vergleichende Viskositätsuntersuchung des Blutserums (**Bioc. Zschr. 183** — 245 — 1927).

292. STERN R. — Über den Mechanismus der serologischen Luesreaktionen (**Id. 144** — 115 — 1924).

293. THOMPSON W. B. — Studies in the blood relationship of animals as displayed in the composition of the serum proteins (**Journ. biol. chem. 1** — 20 — 1915).

294. TOYAMA I. — Relative abundance of serum proteins in albino rats of different ages (**Journ. biol. chem. 38** — 161 — 1919).

295. TRŒNSEGARD N. et B. KOUDAHL. — Cholesterin als prostethische Gruppe im Serumglobulin (**Hoppe-Seylers Zschr. f. Ges. phys. chem. 153** — 3 — 1926).

296. TRŒNSEGARD N. et B. KOUDAHL. — Nachtrag zu der Arbeit «Cholesterin als prostethische Gruppe (**id. 157** — 62 — 1926).

297. UTHEIM K. — A study of the blood and its circulation in normal infants and in infants suffering from chronic nutritional disturbances (**Amer. journ. dis.Childr. 20** — 366 — 1929).

298. UTHEIM K. — Advanced chronic nutritional disturbances in infancy (**Journ. metabol. research I** — **803** — 1922).

299. VAN SLYKE D. D. — H. WU et F. C. McLEAN. — Studies of gas ans electrolyte equilibreia in the blood; V. Factors controlling the electrolyte and water distribution in the blood (**Journ. biol. chem. 10** — 15 — 1911/12).

300. VAN SLYKE D. D. — The analysis of the proteins by determination of the chemical groopscharacteristic of the different amino-acids (**Journ. of. biol. chem. 10** — 15 — 1911/12).

301. VERNEY E. B. — The osmotic pressure of the proteins of human serum and plasma (**Journ. of phys. 61** — 319 — 1926).

301a VLES. — Considérations théoriques sur le point isoélectrique des ampholytes: leur application à la formation des complexes (**Arch. de physique biologique 4** — 228 — 1924).

302. VILA. — Separation des globulines du sérum del cheval (**C. R. Ac. Sc. 175** — 728 — 1922).

303. — Influence de la chaleur et de quelques dissolvants sur la viscosité du sérum de cheval (**is. 174** — 1131 — 1922).

303a WAHL R. — Le problème de la néphrose lipoïdique (**Thèse de Paris 1929**).

304. WALLICH. — Contribution à l'étude des rétentions aqueuses de l'organisme. Recherches sur les albumines du sérum sanguin au cours des cirrhoses du foie (**Thèse de Paris 1930**).

305. WELLS C. E. — The influence of age and of diet the relative proportion of serum protein in the rabbit (**Journ. biol. chem. 15** — 37 — 1913).

306. WELLS H. G. — The chemical basis of immunological specifity (**Journ. immun. 9** — 291 — 1924).

307. WEYL Th. — Beiträge zur Kenntniss tierischer und pflanzlicher Eiweisskörper (**Arch. f. ges. phys. 12** — 635 — 1876 et **Zschr. f. Phys. chem. 1** — 72 — 1877/78).

308. WHIPPLE G. H., H. P. SMITH et A. E. BELT. — Shock as a manifestation of tissue injury following rapid plasma depletion. The stabilizing value of plasma proteins (**Amer. journ .phys. 52** — 72 — 1920).

309. WHIPPLE G. H. — Fibrinogen-I An investigation concerning its origin and destruction in the body (**Amer. journ. phys. 33** — 50 — 1914).

310. WIENER H. — Über quantitative Globulinbestimmungen mittels Ammonsulfatfällung und über die Reindarstellung von Globulinen (**Zschr. phys. Chem. 74** — 29 — 1911).

311. WILLIAMSON S., F. C. MANN et F. J. HECK. — A study of fibrinogen following removal of the liver (**Amer. journ. phys. 59** — 487 — 1922).

312. WOOLSEY J. H. — Studies in the blood relationship of animals as displayed in the composition of the proteins-II A comparison of the ox, sheep,

hog goat, dog, cat and guinea pig with respect to their content of various proteins (**Journ. biol. chem. 433** — 1913).

313. WU H. — A new colorimetric method for the determination of plasma proteins (**Journ. biol. chem. 51** — 33 — 1922).
314. WU H., HSIEN et SCHMOLL M. LANG. — Note on colorimetric determination of serum proteins by means of phenol reagent (**Chin. j. phys. 2** — 399 — 1928).
315. Wu H. et D. YEN. — Studies of the senaturation of proteins (**Journ. biol. Japan 4** — 345 — 1924).
316. WU H. et D. Y. WU. — Nature of heat denaturation of proteins (**Journ. biol. chem. 64** — 369 — 1925).

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 7

ETAT ACTUEL DE NOS CONNAISSANCES SUR LES PROTIDES SANGUINS 10

GUINS 10

Fibrinogène 11

Sérumalbumine 12

Myxoprotéine 14

Sérumglobuline 21

Relation des différentes protéines 21

Relations entre les protides sanguins et les lipides .. 25

Origine des protides du sang 30

Fonctions des protides du sérum 33

VARIATIONS QUANTITATIVES DES PROTIDES DU SÉRUM SANGUIN A L'ÉTAT NORMAL ET PATHOLOGIQUE 36

SÉPARATION ET DOSAGE DES DIFFÉRENTS PROTIDES 42

Séparation 42

Méthodes de dosage 46

RECHERCHES PERSONNELLES 55

PREMIÈRE PARTIE 61

Résultats fournis par une seule précipitation acétonique 66

Résultats fournis par l'emploi de plusieurs précipitations acétoniques 71

Technique de dosage des protides totaux et des globulines de pH 5,5 75

DEUXIÈME PARTIE

Sur la nature des corps précipités sous le nom de globulines par les différentes techniques 82

TROISIÈME PARTIE

Recherches concernant l'isolement de la myxoprotéine de PIETTRE 87

CONCLUSIONS 96

BIBLIOGRAPHIE 99

Imprimeries
des
Éditions Universitaires de Strasbourg
Strasbourg - Nancy
1931